

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DABNA HELLEN TOMIM

PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS DESCENDENTES DA MODULAÇÃO DA DOR
NO EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL EM RATOS

CURITIBA
2013

DABNA HELLEN TOMIM

PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS DESCENDENTES DA MODULAÇÃO DA
DOR NO EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luana Fischer.

Co-orientador: Prof. Marcelo M. S. Lima

CURITIBA
2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, e a Mãe protetora Nossa Senhora e seu filho Jesus, que me guiaram em cada passo dessa árdua caminhada. Em momentos difíceis, nos quais nos encontramos desanimados, era apenas pedir-lhes ajuda, que logo nossas forças são renovadas para se levantar e iniciar novamente o desafio.

Aos que fizeram de mim o que sou hoje, meus queridos pais, José Carlos Tomim e Fátima Minto Tomim. Exemplos de pessoas as quais sou extremamente grata por tudo, meus espelhos, batalhadores, que começaram sua vida juntos de maneira muito humilde, e trabalharam intensamente durante anos para criar, educar e fazer de seus filhos ótimas pessoas. Ao meu irmão Leandro Tomim, que infelizmente, devido a minha vida acadêmica fora de minha cidade, não pude acompanhar por completo seu desenvolvimento, mas hoje vejo que se tornou um belo rapaz, e já irá também começar sua vida acadêmica, mas que para mim será sempre meu irmãozinho. Agradeço de imenso coração por todo apoio, amor e carinho prestados a mim, mesmo não estando presentes. Aos meus avós, que me criaram como filhos, me educando, me dando muito amor e carinho, América Rodrigues Minto e Bolivar Minto, Eva Ferreira Tomim e Antônio Tomim. Sou muito grata a todos vocês e os amo muito. Família nós não podemos escolher, mas se eu pudesse ter escolhido, não seria tão maravilhosa como é.

A meu querido Willian Zalewski, que desde a graduação esteve presente em momentos muito importantes da minha vida. Sempre me estimulando a buscar cada vez mais conhecimento, que me fez desenvolver a vontade de entrar nesse mundo magnífico e impressionante da pesquisa. Sempre me apoiou nos momentos difíceis e alegres, sempre ouvindo minhas aflições e me animando quando necessário. Eu o amo muito, e agradeço por tudo até hoje, e por tudo que ainda seremos juntos.

Agradeço as minhas amigas de todos os dias, que compartilharam o mesmo teto comigo durante esses anos, Juliana Nadal e Isadora Nogueira Pasqual. Na verdade não exatamente “teto”, mas sim “Lar”, pois embora cada uma com seus afazeres e problemas, estávamos sempre prontas a ajudar, nem que fosse apenas

com uma palavra de conforto, mas que já trazia uma grande calma para nós. Vivemos em harmonia, e agradeço muito por toda a força, por ter tornado essa caminhada mais tranquila ao lado de vocês. Foram muitos bons momentos, e as levarei comigo sempre em meus pensamentos.

Agradeço aos meus colegas de caminhada de laboratório, Betina Aisergart, Rafael Reis, Jéssica Bertolini, Felipe Mendes, Maurício Arase, Vinícius Guilhen, Helena Veiga, agradeço por todas as experiências vivenciadas, risadas, conversas com ratinhos, e até mesmo momentos de tensão. Obrigada por fazerem parte dessa caminhada e que cada um teve seu papel fundamental para esse trabalho. Agradeço em especial minhas amigas Glaucia Tobaldini e Andressa Perin Martins, que além de amigas de laboratório, se tornaram minhas amigas de coração, me acolheram de braços abertos quando cheguei nesse mundo desconhecido, me acalmando e entrando em minha vida para ficar. Obrigada meninas, e espero compartilhar ainda muitas experiências com vocês.

Sim, a amizade, o que seria do ser humano sem amigos? Durante essa caminhada, fiz verdadeiros amigos, que além de trocar experiências de trabalho, trocamos experiências de vida, angústias, alegrias, esperanças. Esses amigos foram essenciais para o meu desenvolvimento nesse período, agradeço de coração à Juliane Ceron, Priscilla Costa dos Santos, Fabíola Nihi, Claudia Pudell, que me acolheram muito bem quando cheguei ao departamento. Ao João Victor Peixoto, amigo da mesma turma de mestrado, que por algum tempo fomos “filhos únicos” e então nos ajudávamos e trocávamos boas experiências. Aos meus amigos do laboratório de Neurofisiologia, principalmente ao Adriano Targa Dias, Ana Nosedá e Laís Rodrigues Soares, que me ajudaram muito nesse mestrado, se tornando grandes amigos e confidentes. Agradeço de modo geral a todos meus colegas do departamento, que de alguma maneira contribuíram de forma importante, nem que fosse apenas para me dar aquele BOM DIA empolgante pelos corredores que já animava meu dia, ou apenas pela preocupação em perguntar como eu estava. Obrigada por tudo.

Agradeço a todos meus professores do programa de pós-graduação em Fisiologia que contribuíram para minha formação. A professora Anete Curte Ferraz por ter me auxiliado em umas das disciplinas mais importantes da pós-graduação, a

Prática Docência, me motivando e ensinando com seu carisma e simpatia, e claro com muita elegância. Agradeço a professora Joice da Cunha, do programa de pós-graduação em Farmacologia, que me auxiliou no aprendizado da cirurgia estereotáxica da vPAG, sendo a chave principal da minha dissertação. E agradeço em especial a meus orientadores, a professora Luana Fischer, que me acolheu como orientanda confiando em meu potencial, que foi a responsável por grande parte de tudo que aprendi durante essa importante fase de minha vida. Agradeço também ao meu co-orientador professor Marcelo M. S. Lima, pelos ensinamentos, sempre estava à disposição para ajudar, sempre muito prestativo e presente.

Agradeço pela Universidade Federal do Paraná, e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro ao meu mestrado.

RESUMO

A privação do sono paradoxal (PSP) pode alterar a sensibilidade à dor ou predispor ao desenvolvimento de condições dolorosas. No entanto pouco é conhecido a respeito dos mecanismos pelos quais a privação de sono afeta a dor. A PSP diminui o efeito analgésico da morfina, que depende da ativação do sistema descendente da modulação da dor, compreendendo a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) e Bulbo RostroVentral Medial (RVM). Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a PSP aumenta a nocicepção fásica e tônica, por meio do teste de formalina, e diminui o efeito antinociceptivo da morfina administrada na PAG ventral (vPAG). Nós avaliamos também se a PSP aumenta a dor por modular a atividade endógena do sistema descendente da modulação da dor. Ratos foram separados em dois grupos, controle e submetidos à privação de sono paradoxal (PSP) por meio da técnica de plataforma única. Primeiramente foi realizada uma curva dose resposta para o teste de formalina (0, 0,5, 0,75 e 1%), sendo a dose de 0,75% escolhida para os experimentos. Os animais foram submetidos a PSP por um período de 24 e 48 horas, e ambos aumentaram a resposta nociceptiva tanto no teste de formalina como no teste de limiar nociceptivo mecânico. PSP diminuiu significativamente o efeito antinociceptivo máximo da administração de morfina na vPAG. Uma dose de antagonista de receptor GABA_A, bicuculina (30 pmol intra-vPAG), que diminuiu a nocicepção em ratos controles, não diminuiu nos ratos privados de sono. Além disso, uma dose de antagonista de CCK2, YM022, (0,5 pmol intra-RVM), que diminuiu a nocicepção em animais privados de sono paradoxal, não diminuiu em animais controles. Enquanto uma dose de agonista de CCK2, CCK-8 (8 pmol intra-RVM), que aumentou a nocicepção em animais controles, não aumentou em animais privados de sono. A expressão de c-Fos foi significativamente maior nos animais privados de sono em relação aos animais controles. Esses resultados são compatíveis com uma diminuição da via descendente inibitória de modulação da dor e um aumento da via descendente facilitatória da modulação da dor em animais privados de sono. Em conclusão, nós demonstramos que a PSP aumenta a resposta de dor tônica inflamatória como a resposta nociceptiva fásica, e diminui o efeito antinociceptivo da morfina administrada na vPAG. Os mecanismos responsáveis pelo efeito pronociceptivo da PSP parece depender de uma alteração da atividade da via descendente de modulação da dor.

Palavras-chave: dor; modulação descendente da dor; morfina; nocicepção; privação de sono paradoxal.

ABSTRACT

Paradoxical sleep deprivation increases phasic nociceptive responses and decreases the antinociceptive effect of systemic morphine in rats. However, the mechanisms underlying the pronociceptive effects of paradoxical sleep deprivation are not known. In this study we asked whether paradoxical sleep deprivation also increases tonic nociception in the formalin test, and decrease the antinociceptive effect of morphine administered into the periaqueductal grey matter, a key region involved in opioid analgesia and endogenous pain modulation. We also asked whether paradoxical sleep deprivation increases pain by modulating the activity of the endogenous descending pain modulation system. Paradoxical sleep deprivation for either 24 or 48 hours equally and significantly increased formalin-induced nociception and decreased nociceptive mechanical paw withdrawn threshold. Paradoxical sleep deprivation significantly decrease the maximal antinociceptive effect induced by the administration of morphine into the ventral periaqueductal grey matter. A dose of the GABA_A receptor antagonist, bicuculine (30 pmol in the ventral periaqueductal grey matter), that decreased nociception in control rats did not in paradoxical sleep deprived ones. Furthermore, a dose of the CCK2 receptor antagonist, YM022 (0.5 pmol intra-rostral ventral medulla), that decreased nociception in paradoxical sleep deprived rats did not in control ones. While a dose of the CCK2 receptor agonist, CCK-8 (8 pmol intra-rostral ventral medulla), that increased nociception in control rats did not in paradoxical sleep deprived ones. c-Fos expression in RVM was significantly higher in sleep deprived animals when compared with control animals. These findings are compatible with a decreased descending pain inhibitory modulation and an increased descending pain facilitatory modulation in sleep deprived rats. In conclusion, we demonstrated that paradoxical sleep deprivation enhances tonic inflammatory, as well as phasic nociceptive responses and decreases the antinociceptive effect of morphine administered into the periaqueductal grey matter. The mechanisms underlying the pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation appears to relies on a modulation of descending pain modulatory activity

Keywords: Pain; sleep; nociception; paradoxical sleep deprivation; descending pain modulation; morphine.

LISTA DE FIGURAS

Figura A - Hipnograma apresentando diferentes estágios do sono.....	15
Figura B - Representação esquemática das principais vias neuronais do sistema descendente da modulação da dor..	17
Figura C - Representação esquemática das distribuição sináptica de receptores $m\mu$ opióides do bulbo rostro ventromedial..	18
Figura D - Representação esquemática das interações de CCK, antagonista de CCK, encefalinas/endorfinas e morfina na produção de dor e analgesia	19
Figure 1 - Dose response curve of formalin	30
Figure 2 - The pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation.	31
Figure 3 - The effect of paradoxical sleep deprivation on morphine-induced antinociception..	33
Figure 4 - The effect of intra-vPAG bicuculline in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats	35
Figure 5 - The effect of intra-RVM YM022 or CCK-8 in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats	37
Figure 6 - The effect of intra-RVM lidocaine in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats	38
Figure 7 – c-Fos expression in vPAG and RVM.....	39
Figure 8 – Representation of injections sites in the vPAG and RVM.....	40

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Efeito (média \pm E.P.M.) da administração de drogas intra-vPAG ou intra-RVM no comportamento locomotor no teste de campo aberto34

Table 1 – Effect (mean \pm E.P.M.) of intra-vPAG or intra-RVM drug injections on the locomotor behavior in the open field test.....34

LISTA DE SIGLAS

CCK	Colecistocinina
DNIC	Controle Inibitório Difuso Nocivo
EEG	Eletroencefalograma
EPM	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido Gamma-Amino Butírico
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PSD	Privação de Sono Paradoxal
PSP	Privação de Sono Paradoxal
REM	Movimentos Rápidos dos Olhos
RVM	Bulbo Ventromedial Rostral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	2.1. SONO	14
	2.2. SISTEMA DESCENDENTE DA MODULAÇÃO DA DOR	16
	2.3. RELAÇÃO ENTRE SONO E DOR	20
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
4	ARTIGO CIENTÍFICO	22
	Introduction	24
	Materials and Methods.....	26
	Results	30
	Discussion	41
5	DISCUSSÃO	46
	Caracterização do efeito pró-nociceptivo da PSP.....	47
	O efeito pró-nociceptivo da PSP na analgesia induzida pela administração de morfina na vPAG	48
	A PSP e sua contribuição na atividade endógena das vias descendentes da modulação da dor	49
	Considerações Finais	51
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios no padrão normal de sono têm se tornado um problema de grande impacto na sociedade atual, possivelmente em virtude do estresse e do acelerado ritmo das atividades diárias que caracterizam a vida nas grandes cidades. Dados obtidos no Instituto do Sono da Universidade Federal de São Paulo indicam que 77% da população dessa cidade sofre com algum problema relacionado ao sono (Santos-Silva et al. 2009). Está bem determinado que alterações no padrão normal de sono estão associadas a graves prejuízos econômicos e de saúde, inclusive aumentando o risco de mortalidade por causas variadas (Ranjbaran et al. 2007).

Assim como os distúrbios de sono, a dor tem se tornado um problema cada vez mais comum na sociedade moderna. Não há dados sobre a prevalência da dor no Brasil, mas, extrapolando dados da população americana (IOM 2011) para a brasileira, chegaríamos ao número de setenta e três milhões de pessoas nessa condição em todo o país. Certamente este é um dos maiores problemas da saúde pública, possivelmente a nível mundial, que além de afetar diretamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, está associado a um gigantesco impacto econômico.

Recentemente, vários estudos têm investigado a relação entre percepção à dor e distúrbios de sono (Morin et al. 1998; Onen et al. 2000; Smith et al. 2000; Onen et al. 2001b; Andersen et al. 2004; Nicholson and Verma 2004; Nascimento et al. 2007; Wei et al. 2008; Damasceno et al. 2009; Wei et al. 2010; Azevedo et al. 2011; Skinner et al. 2011; Damasceno et al. 2013). A partir desses estudos ficou claro que essa é uma relação bidirecional, uma vez que a dor pode causar distúrbios no sono (Mori et al. 1998; Smith 2000; Nicholson and Verma 2004) e distúrbios do sono podem alterar a sensibilidade a dor ou predispor ao desenvolvimento de condições dolorosas (Onen et al. 2000; Wei et al. 2008; Damasceno et al. 2009; Wei et al. 2010; Damasceno et al. 2013).

O crescente número de estudos investigando a interação entre sono e dor e a unanimidade de resultados indicando que a privação de sono tem papel pró-nociceptivo contrasta com o pobre entendimento a respeito dos mecanismos pelos quais a privação de sono afeta a dor. Os poucos estudos que investigaram os mecanismos envolvidos no efeito pró-nociceptivo da privação de sono se concentraram em mecanismos espinhais, ou utilizaram intervenções sistêmicas. Por

exemplo, já foi demonstrado que a privação de sono paradoxal modula a atividade serotoninérgica (Wei et al. 2008; Ohayon 2009), aumenta a glutamatérgica (Wei et al. 2007) e diminui a GABAérgica (Wei et al. 2010) ao nível espinhal. Além disso, a privação de sono paradoxal diminui o efeito antinociceptivo induzido pela administração sistêmica de agonista dopaminérgico (Skinner et al. 2011), assim como demonstrado para agonistas opióides (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011). Com relação à analgesia opióide, já está bem determinado que a privação do sono paradoxal a afeta de forma importante, pois já foi demonstrado que a analgesia induzida pela administração sistêmica de morfina é diminuída pela privação de sono paradoxal (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011).

A administração sistêmica de morfina induz analgesia ao ativar receptores opióides localizados em três diferentes níveis do neuroeixo: supra-espinhal; espinhal e periférico. A analgesia mediada pela ativação de receptores opióides supra-espinhais depende da ativação farmacológica de mecanismos envolvidos no sistema descendente de modulação da dor. Portanto, se a privação de sono diminui a analgesia induzida pela administração sistêmica de morfina, que é mediada, em parte, pela ativação de mecanismos envolvidos no sistema descendente de modulação da dor, é possível que o efeito pró-nociceptivo da privação de sono seja mediado por alterações na atividade desse sistema endógeno de modulação da dor.

O sistema descendente da modulação da dor pode facilitar ou inibir a transmissão da informação nociceptiva, podendo ter ação pró-nociceptiva ou antinociceptiva, respectivamente. A via de facilitação da informação nociceptiva pode ser ativada por meio da estimulação de receptores para CCK, um neuropeptídeo que age em receptores CCK 2 localizados no RVM, causando o aumento a nocicepção (Xie et al. 2005), e a via de inibição pode ser ativada por meio de estimulação por opióide ou antagonista GABAérgico (Fields 1994; Millan 2002). Desse modo, nesse trabalho, foi utilizada uma abordagem farmacológica a fim de ativar ou inibir tais vias e comparar seu efeito da resposta nociceptiva em ratos controles e privados de sono.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SONO

O sono pode ser dividido em dois estados: não-REM (do inglês, *Rapid Eye Movement*) e REM (figura A) (Ranjbaran et al. 2007; Hobson 2009). Esses estágios são classificados por meio de eletroencefalograma, eletromiograma e eletro-oculograma. O sono não-REM pode ser subdividido em quatro fases, sendo a terceira e a quarta consideradas fases tranquilas de sono ou sono de ondas lentas. O sono REM ou paradoxal é definido por uma diminuição do tônus muscular, maior ativação do eletroencefalograma (EEG) e movimentos rápidos dos olhos captados pelo eletro-oculograma, sendo essas duas últimas características parecidas com as encontradas durante o ciclo de vigília, sendo por isso também conhecido como sono paradoxal (Ranjbaran et al. 2007), termo que será utilizado neste trabalho.

O primeiro marco histórico referente a estudos do sono teve início em 1929, com a obtenção de registros de EEG em humanos, na qual o primeiro registro das ondas cerebrais foi obtido pelo psiquiatra alemão Hans Berger (Berger 1929). Após essa descoberta, Loomis e co-autores, foram os primeiros a diferenciar as fases da vigília, sono e sonhos no EEG em humanos (Loomis et al. 1935). Por meio de suas pesquisas, eles identificaram os estágios de sono e vigília, como também a fase em que os sonhos ocorrem e que esta se encontra com ondas cerebrais em baixa amplitude. Logo após, o cientista alemão Rudolf Klaue, começou a estudar o EEG em gatos, e descobriu uma sequência característica do sono, em que ocorre um período de sono leve, em que o córtex produz ondas lentas, seguido por um período de sono mais profundo, ocorrendo um aumento da atividade cortical (Klaue 1937). Essa fase de sono profundo, só foi denominada de paradoxal, após pesquisas de Aserinsky e Kleitman, que associaram essa fase com movimento ocular rápido (Aserinsky and Kleitman 1953).

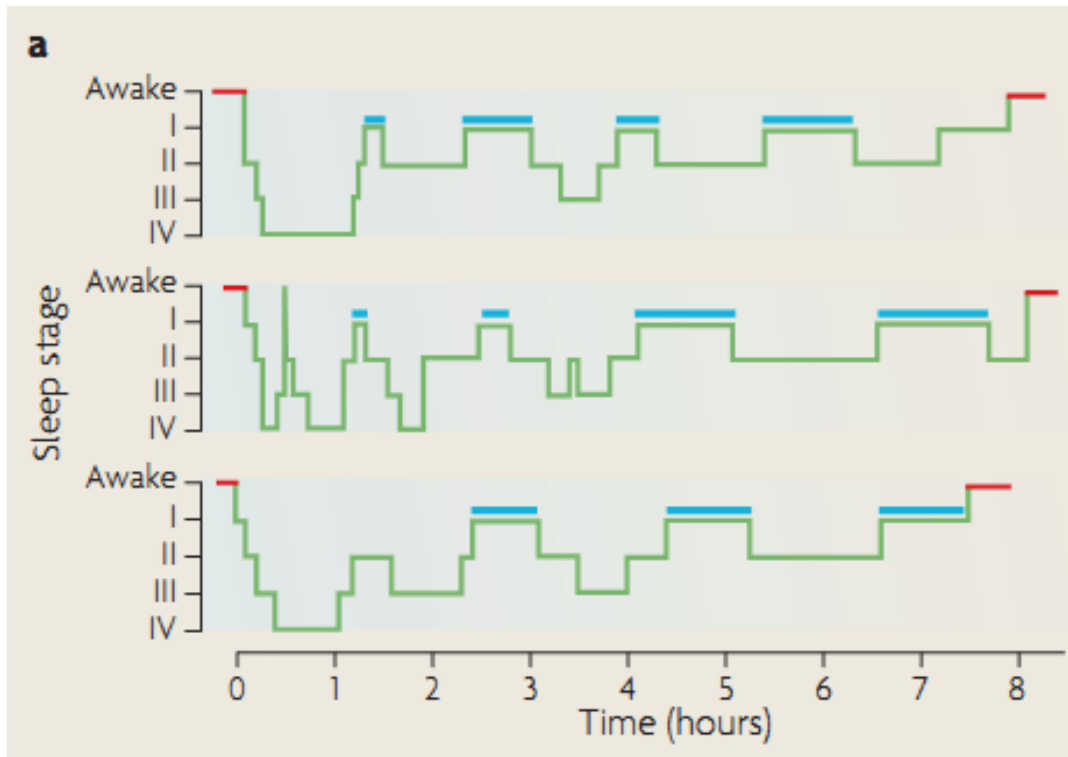


Figura A: representação de um hipnograma demonstrando os diferentes estágios do sono. As linhas azuis representam os momentos de sono paradoxal. Figura demonstrando o ciclo de três indivíduos diferentes. (Figura adaptada de HOBSON 2009, REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness: Nat Rev Neurosci. 2009 Nov;10(11):803-13.

Uma das funções do sono consiste em manter o organismo num estado em que se encontra em repouso para desempenhar as funções no restabelecimento e manutenção da homeostasia orgânica, que ocorrem principalmente enquanto o indivíduo está dormindo (Andersen et al. 2004; Nascimento et al. 2007; Landolt 2008; Son et al. 2011). Distúrbios do sono podem ocasionar alterações orgânicas resultando em disfunções no controle homeostático. Essa disfunção do controle homeostático interfere negativamente na qualidade de vida das pessoas (Ranjbaran et al. 2007).

A maioria dos distúrbios de sono se caracteriza por prejuízos ou diminuição da fase de sono paradoxal (Carli et al. 1987), que ocorre, em geral, durante a segunda metade da noite. Por esta razão, a maioria dos estudos experimentais utiliza a privação de sono paradoxal (PSP), pois tal procedimento é considerado semelhante às situações de fragmentação do sono, devido aos momentos de despertar repetidos, podendo ser considerada uma ferramenta útil para investigar os efeitos da perda do sono (Machado et al. 2005).

2.2. SISTEMA DESCENDENTE DA MODULAÇÃO DA DOR

Os primeiros estudos envolvendo a analgesia produzida por estimulação da PAG são provenientes do final da década de 60. Experimentos realizados com ratos, nos quais um teste simples de reflexo de retirada era utilizado, demonstraram que uma região mesencefálica, nesse caso a PAG, quando estimulada causava uma inibição da resposta comportamental ao estímulo nocivo (Reynolds 1969; Mayer et al. 1971).

A PAG consiste numa região central pertencente ao sistema descendente da modulação da dor. Esta região emite eferências para o RVM, que a partir dessa região pode facilitar ou inibir a transmissão da informação nociceptiva em nível de corno dorsal, tendo, portanto, papel pró ou antinociceptivo, dependendo dos mecanismos ativados (Millan 2002; Fields 2004). Conforme ilustrado na figura B, a PAG, ao integrar múltiplas aferências provenientes de diversas regiões centrais e da periferia, modula a nocicepção por meio da conexão com neurônios do (RVM), região que inclui o núcleo magno da rafe e formação reticular adjacente. Os neurônios provenientes do RVM se projetam, através do funículo dorsolateral, para o corno dorsal da medula espinhal onde controlam a passagem do impulso nociceptivo (Millan 1999; 2002; Fields 2004). Portanto, a ativação de neurônios no RVM pode facilitar ou inibir a transmissão da informação nociceptiva ao nível do corno dorsal. Esse aparente paradoxo pode ser explicado pela ativação de duas classes de neurônios no RVM, diferenciadas pelo início da atividade elétrica em resposta a um reflexo nociceptivo (por exemplo, reflexo de retirada da pata ou cauda em resposta a estímulo térmico ou mecânico). As células “on” iniciam e as células “off” interrompem sua atividade elétrica imediatamente antes do reflexo nociceptivo. Ambas as células se projetam do RVM para a medula espinhal, as células “on” exercem ação facilitatória sob a transmissão da informação nociceptiva, o que está de acordo com seu padrão de disparo coincidente com o reflexo nociceptivo. As células “off” inibem a transmissão da informação nociceptiva, o que também está de acordo com seu padrão de disparo que é interrompido antes do reflexo nociceptivo. Portanto, uma maior ativação das células “off” está associada a inibição da transmissão nociceptiva enquanto uma maior ativação das células “on” está associada a sua facilitação. Os mecanismos que determinam a ativação de determinada classe de células em detrimento da outra não são totalmente conhecidos, mas o tônus opioidérgico na

PAG e RVM certamente é o mais estudado e talvez importante. As células “on” expressam receptores opióides mu e as células “off” são inibidas por um mecanismo GABAérgico que é inibido pela ativação de receptores opióides mu (Figura C).

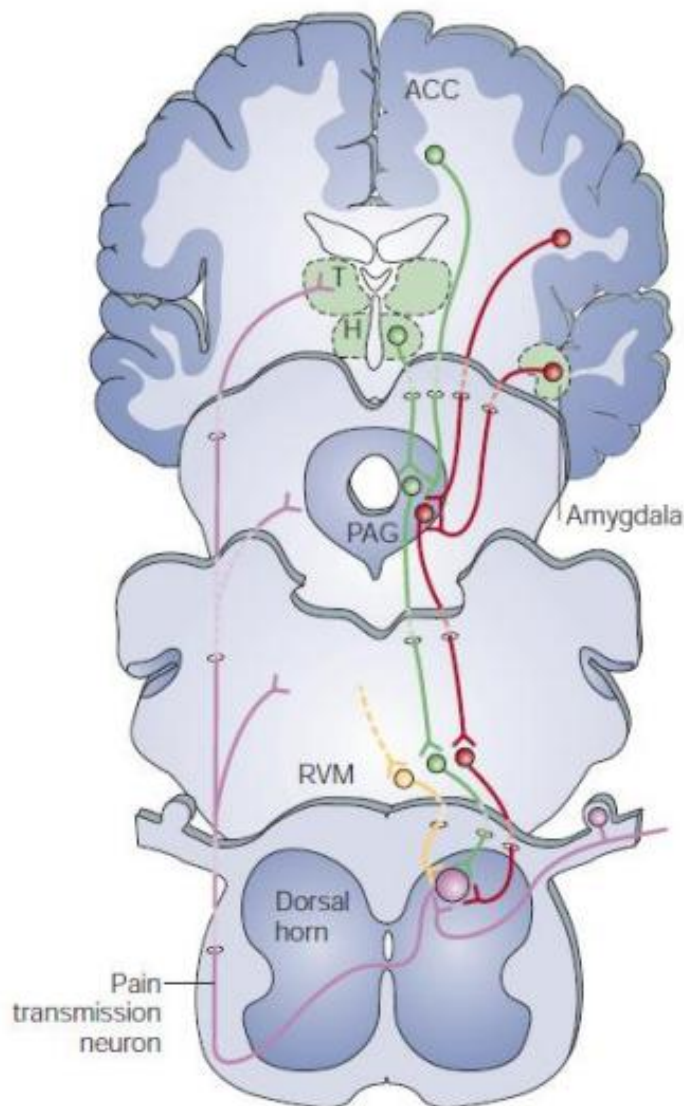


Figura B: Representação esquemática das principais vias neuronais envolvidas na transmissão da informação nociceptiva (vias em roxo) e no sistema descendente de modulação da dor (vias em verde, vermelho e amarelo).

A informação nociceptiva é transmitida dos nociceptores primários para neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal (neurônios de segunda ordem). Os axônios desses neurônios atravessam para a região contralateral da medula espinhal, formando um trato que ascendente pelo quadrante anterolateral e termina em distintas áreas do tronco cerebral e tálamo (T). A partir dessas regiões a informação nociceptiva é transmitida (por neurônios de terceira ordem) para diversas áreas corticais que controlam diferentes aspectos da experiência dolorosa. A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é a região que controla os mecanismos envolvidos no sistema descendente de modulação da dor. Para isso, integra múltiplas aferências provenientes diretamente da periferia e de áreas prosencefálicas límbicas (incluindo o córtex cingulado anterior, ACC), outras áreas corticais frontais, hipotálamo

(H) e do núcleo central da amígdala. Ao ativar vias descendentes que partem do bulbo rostroventromedial (RVM) e trafegam pelo funículo dorsolateral, a PAG controla indiretamente a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal medula espinhal. Essas vias descendentes podem exercer tanto controle inibitório (verde) quanto facilitatório (vermelho) da transmissão da informação nociceptiva ao nível do corno dorsal espinhal. Um canal de controle separado, através de neurônios serotoninérgicos no RVM (amarelo), também pode facilitar ou inibir a transmissão da informação nociceptiva (Figura retirada de FIELDS, 2004, State-dependent opioid control of pain: Nat Rev Neurosci. 2004 Jul;5(7):565-75).

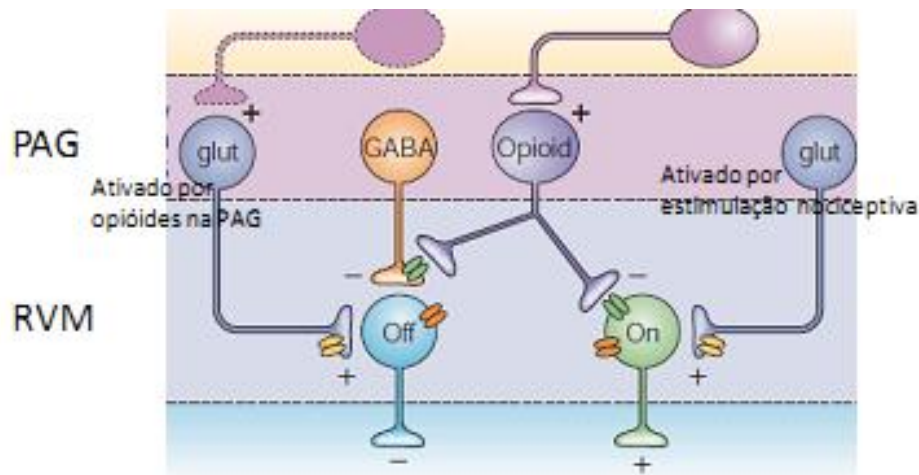


Figura C: Distribuição sináptica de receptores opióides mu (em verde) nas células “on” e “off” do bulbo rostral ventromedial (RVM). Receptores opióides mu estão localizados no soma das células “on” e nas terminações dos neurônios GABAérgicos que inibem as células “off”. (Figura adaptada de FIELDS, 2004, State-dependent opioid control of pain: Nat Rev Neurosci. 2004 Jul;5(7):565-75).

Portanto, a liberação endógena de opióides ou a administração de agonistas de receptores opióides mu, como a morfina, inibe diretamente as células “on” e ativa indiretamente (por meio da desinibição GABAérgica) as células “off”. Esse mecanismo explica por que antagonistas de receptores GABA_A, que estão normalmente associados a uma ação pró-nociceptiva, quando administrados na PAG ou RVM induzem analgesia (Heinricher et al. 1992; Fields 2004).

Os mecanismos que medeiam a atividade descendente facilitatória são bem menos conhecidos, no entanto evidências recentes apontam para um papel central da Colecistocinina (CCK) (Heinricher et al. 2001; Heinricher and Neubert 2004; Xie et al. 2005). A CCK pode ser considerada um “anti-opióide” endógeno (Faris et al. 1983), uma vez que suas ações excitatórias antagonizam os mecanismos opioidérgicos e seus receptores têm distribuição similar aos receptores opióides (Ghilardi et al. 1992). Dados obtidos em estudos eletrofisiológicos demonstram que a administração de CCK no RVM ativa diretamente as células “on” (Heinricher and Neubert 2004) e inibe a ativação das células “off” em resposta a morfina (Fields 2004). Dados funcionais corroboram essas observações ao demonstrar que a manutenção de estados de dor persistente, classicamente associados a mecanismos facilitatórios descendentes, depende da liberação endógena de CCK e ativação de receptores CCK2 (figura D) (Baber et al. 1989; Kovelowski et al. 2000; Ambriz-Tututi et al. 2011).

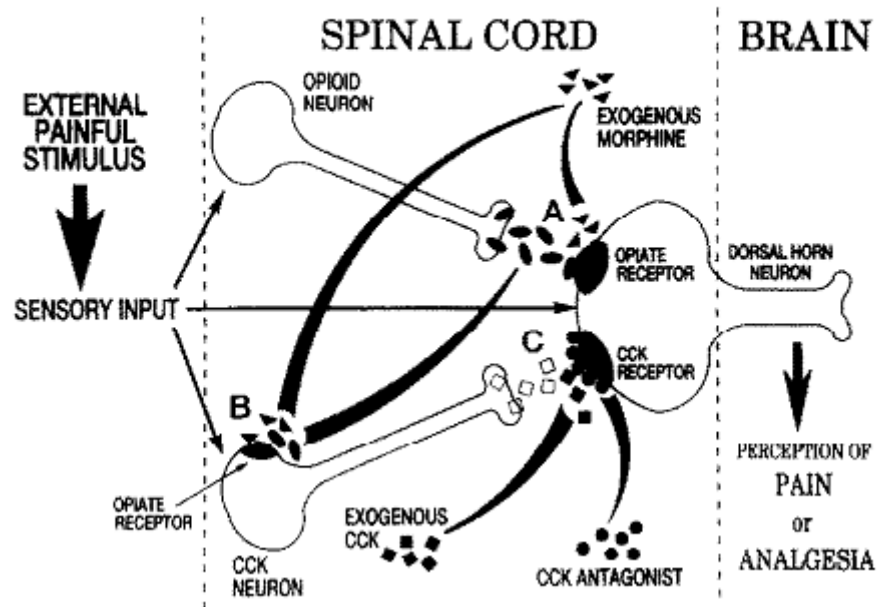


Figura D: representação esquemática das interações de CCK, CCK antagonista, encefalinas/endorfinas e morfina na produção de dor e analgesia. Um estímulo nocivo ativa o neurônio sensorial do corno dorsal diretamente pela via encefalinas/endorfinas ou via neurônios de CCK. Encefalinas/endorfina liberadas nesses neurônios estimulam receptores de opióide no corno dorsal da medula espinhal (A); o receptor pode também ser estimulado por morfina exógena. Como consequência, o disparo dos neurônios do corno dorsal é reduzido resultando na analgesia. Além disso, morfina ou encefalinas/endorfinas endógenas estimulam receptor de opióide no neurônio CCK (B). A liberação de CCK de seu próprio neurônio estimula receptor de CCK no corno dorsal, que pode ser estimulado também por CCK exógeno (C), como consequência o limiar nociceptivo diminui. Os efeitos da CCK em seu receptor são bloqueados por um antagonista, resultando no aumento da analgesia induzida por opióide endógeno e exógeno. (Figura BABER et al. 1989, The role of CCK, caerulein, antagonists in nociception. Pain 1989;39(3):307-328).

Estudos já demonstraram que a PSP diminui a analgesia da morfina sistêmica (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011), e como já citado anteriormente, a morfina possui ação no sistema descendente da modulação da dor. Desse modo é possível que o efeito pró-nociceptivo da privação de sono seja mediado por alterações na atividade desse potente sistema endógeno de modulação da dor.

2.3. RELAÇÃO ENTRE SONO E DOR

Atualmente, distúrbios do sono e condições dolorosas estão se tornando cada vez mais comuns na sociedade moderna. Há evidências indicando que esses dois problemas de saúde possuem uma relação bi-direcional. Em humanos, condições dolorosas podem alterar o padrão normal de sono (Morin et al. 1998; Smith et al. 2000; Nicholson and Verma 2004) e distúrbios do sono podem aumentar a dor clínica reportada pelos indivíduos (Gupta et al. 2007; Edwards et al. 2008; Haack et al. 2009).

Experimentalmente, está bem determinado que a privação de sono paradoxal em animais diminui o limiar nociceptivo mecânico (Wei et al. 2007; Wei et al. 2008; Wei et al. 2010; Damasceno et al. 2013) e térmico (Nascimento et al. 2007; Damasceno et al. 2009; Skinner et al. 2011). A avaliação de respostas nociceptivas reflexas, como é o caso nesses modelos de retirada de pata ou cauda em resposta a estímulos nociceptivos mecânicos ou térmicos, é uma ferramenta amplamente utilizada e de reconhecida validade no estudo de mecanismos nociceptivos. No entanto, esses modelos não são ideais para representar experimentalmente a dor clínica em humanos, uma vez que os mecanismos que medeiam respostas nociceptivas fásicas divergem daqueles que medeiam respostas nociceptivas de caráter tônico ou persistente (Wei et al. 2007). Embora alguns poucos estudos tenham demonstrado que a privação de sono paradoxal aumenta a resposta nociceptiva a estímulos fásicos em modelos de dor neuropática (Andersen et al. 2004; Wei et al. 2007) e artrítica (Andersen et al. 2004) não há dados que demonstrem que a privação de sono afeta a nocicepção em modelos de dor tônica ou inflamatória.

A injeção de formalina na pata de ratos é um modelo clássico de nocicepção, induz resposta nociceptiva de caráter tônico, com duração de aproximadamente uma hora e numa perspectiva clínica, seu uso experimental satisfaz os critérios para simular a dor inflamatória em humanos (Tjolsen et al. 1992; Morris 2003). Aparentemente um único estudo avaliou o efeito da privação de sono na nocicepção induzida pela formalina e o resultado encontrado sugere que a PSP não afeta a nocicepção nesse modelo (Onen et al. 2001b). No entanto, uma dose muito alta (5%) de formalina foi utilizada, com tal dose é impossível visualizar qualquer aumento em sua resposta em ratos.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante do exposto, é possível observar que embora alguns trabalhos já tenham estudado a relação entre distúrbios do sono e dor, pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais tais distúrbios aumentam a dor. Assim sendo, o primeiro objetivo desse estudo foi investigar e comparar o efeito da PSP em modelo de dor tônica inflamatória, por meio do teste de formalina, e em dor fásica, por meio do teste de limiar mecânico em ratos. O segundo objetivo desse estudo foi demonstrar o efeito da PSP no efeito antinociceptivo da morfina administrada na vPAG. E finalmente, o terceiro objetivo, foi investigar se a PSP aumenta a dor por diminuir a atividade descendente inibitória da modulação da dor e/ou por aumentar a ativação da via descendente facilitatória da modulação da dor.

1- Para isso, inicialmente foi avaliado se a privação de sono paradoxal aumenta a resposta nociceptiva induzida por estímulo tônico (injeção de formalina na pata), assim como sabidamente o faz para estímulos fásicos (limiar nociceptivo mecânico).

2- Foi avaliado se a privação de sono paradoxal diminui a analgesia induzida pela administração de morfina na vPAG, analgesia essa que, como discutido acima, depende da ativação farmacológica de mecanismos inibitórios e inibição de mecanismos facilitatórios descentes.

3- A resposta à administração de antagonista GABA_A na vPAG foi comparada em ratos controle e com privação de sono paradoxal, e foi utilizada como ferramenta farmacológica para verificar se a privação de sono paradoxal diminui a atividade descendente inibitória.

4- A resposta à administração de antagonista ou agonista de receptores CCK2 no RVM foi comparada em ratos controle e com privação de sono paradoxal, e foi utilizada como ferramenta farmacológica para verificar se a privação de sono paradoxal aumenta a atividade descendente facilitatória

5- A resposta à administração de lidocaína no RVM foi comparada em ratos controle e com privação de sono paradoxal, e foi utilizada como ferramenta farmacológica adicional para verificar se a privação de sono paradoxal aumenta a atividade descendente facilitatória.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

The pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation in rats: evidence for a role of descending pain modulation mechanisms

Dabna H. Tomim; Felipe Mendes; Jessica Bertolini; Mauricio Arase; Glaucia
Tobaldini; Marcelo M. S. Lima; Luana Fischer

Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal University of
Parana, Curitiba, Parana, Brazil

Corresponding author:

Luana Fischer, Tel.: +55 41 3361-1738.

E-mail address: fischer@ufpr.br (L. Fischer).

Original Article

Keywords: Pain; sleep; nociception; paradoxical sleep deprivation; descending pain modulation; morphine.

Abstract

Paradoxical sleep deprivation increases phasic nociceptive responses and decreases the antinociceptive effect of systemic morphine in rats. However, the mechanisms underlying the pronociceptive effects of paradoxical sleep deprivation are not known. In this study we asked whether paradoxical sleep deprivation also increases tonic nociception in the formalin test, and decrease the antinociceptive effect of morphine administered into the periaqueductal grey matter, a key region involved in opioid analgesia and endogenous pain modulation. We also asked whether paradoxical sleep deprivation increases pain by modulating the activity of the endogenous descending pain modulation system. Paradoxical sleep deprivation for either 24 or 48 hours equally and significantly increased formalin-induced nociception and decreased nociceptive mechanical paw withdrawal threshold. Paradoxical sleep deprivation significantly decrease the maximal antinociceptive effect induced by the administration of morphine into the ventral periaqueductal grey matter. A dose of the GABA_A receptor antagonist, bicuculine (30 pmol intra-periaqueductal grey matter), that decreased nociception in control rats did not decrease in paradoxical sleep deprived ones. Furthermore, a dose of the CCK2 receptor antagonist, YM022 (0.5 pmol intra-rostral ventral medulla), that decreased nociception in paradoxical sleep deprived rats did not in control ones. While a dose of the CCK2 receptor agonist, CCK-8 (8 pmol intra-rostral ventral medulla), that increased nociception in control rats did not in paradoxical sleep deprived ones. These findings are compatible with a decreased descending pain inhibitory modulation and an increased descending pain facilitatory modulation in sleep deprived rats. In conclusion, we demonstrated that paradoxical sleep deprivation enhances tonic inflammatory, as well as phasic nociceptive responses and decreases the antinociceptive effect of morphine administered into the periaqueductal grey matter. The mechanisms underlying the pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation appears to relies on a modulation of descending pain modulatory activity

Keywords: Pain; sleep; nociception; paradoxical sleep deprivation; descending pain modulation; morphine.

1. Introduction

The quantity and quality of sleep is essential for healthy brain functioning and organic homeostasis. The prevalence of sleep disturbances is increasing in the general population, being insomnia the most common with a prevalence ranging from 12 to 20% (Wallace et al. 2012; Buysse 2013). There are evidences indicating a reciprocal relationship between sleep disturbances and pain. Painful conditions can alter normal sleep pattern (Morin et al. 1998; Smith et al. 2000; Nicholson and Verma 2004) and sleep disturbance can enhance self reported clinical pain (Gupta et al. 2007; Edwards et al. 2008; Haack et al. 2009) in humans. In animals, there is a body of evidence showing that paradoxical sleep deprivation (PSD) enhances phasic nociceptive responses (Onen et al. 2000; Wei et al. 2008; Damasceno et al. 2009; Wei et al. 2010; Damasceno et al. 2013). However, there is no evidence that sleep deprivation increases pain in tonic inflammatory models, considered more representative of clinical pain conditions. In addition, the mechanisms by which sleep deprivation increases pain are poorly understood.

It was already determined that PSD modulates the serotonergic system (Wei et al. 2008; Ohayon 2009), increases glutamatergic (Wei et al. 2007) and reduces GABAergic activity (Wei et al. 2010) at spinal level. Moreover, PSD decreases the antinociceptive effect induced by systemic administration of morphine (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011). An essential neural circuit for morphine analgesia is the descending pain modulation system (Fields 2004), in which the Periaqueductal Gray Matter (PAG) through its projections to the rostral ventromedial medulla (RVM), controls nociceptive transmission at the spinal cord (Millan 2002). This system has two kinds of descending efferences, while the pain inhibitory pathways decrease spinal nociceptive transmission; the pain facilitatory pathways increase it (Millan 2002). The effect of PSD on the analgesia induced by morphine administered into the PAG is not known. However, considering that PSD decreases systemic morphine analgesia, which depends on the descending pain modulation system, it is possible that PSD increases pain by modulating such system.

The first aim of this study was to investigate and compare the effect of PSD in a tonic inflammatory pain model, the rat formalin test, and in a phasic pain model, the rat mechanical paw withdrawal test. The second aim of this study was to demonstrate

the effect of PSD in the antinociceptive effect of morphine administered into the PAG. Finally, the third aim of this study was to investigate whether PSD increases pain by decreasing the activation of the descending pain inhibitory pathways or/and by increasing the activation of descending pain facilitatory pathways. To assess this issue we used a pharmacological approach to activate or inhibit such pathways and compared its effect on the nociceptive response in control and sleep deprived rats. General exploratory activity was evaluated in an open-field to avoid confusing results due to drug effects on locomotor activity,

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The experiments were performed in male Wistar rats (230 – 300g). The animals were housed in cages with *ad libitum* access to rat chow and water. They were maintained in a room with controlled 12:12 h light/dark cycle and temperature ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). All animal experimental procedures and protocols were approved by the local Committee on Animal Research of the Federal University of Parana and followed the guidelines of the Ethics Standards of the International Association for the Study of Pain in animals (Zimmermann 1983).

2.2 Drugs

Formalin (an aqueous solution of 37% formaldehyde dissolved in 0.9% NaCl to a concentration of 0.5, 0.75 and 1%, administered in the rat's paw); morphine, an opioid receptor agonist (0.9 nmol or 9 nmol, administered into the ventral PAG, Morgan et al. 2009); bicuculline, a GABA_A receptor antagonist (30 pmol, 90 pmol or 300 pmol, administered into the ventral PAG, Morgan and Clayton 2005); YM022, a cholecystinin 2 (CCK 2) receptor antagonist (0.5 or 2 pmol, administered into the RVM, Xie et al. 2005); CCK-8, a CCK 2 receptor agonist (8 or 26 pmol, administered into the RVM, Vera-Portocarrero et al. 2011); QX-314, lidocaine–ethyl bromide (2%, administered into the RVM, Saade et al. 2010) were purchased from Sigma St Louis MO, except YM022 obtained from Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK. All drugs were dissolved in 0.9% NaCl.

2.3 Stereotaxy Surgery

The rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and placed in a stereotaxic instrument. The skull was exposed and a small hole was made for introduce a 26-gauge guide cannula into ventral PAG or RVM. For the placement of the cannula into ventral PAG, it was utilized the following coordinates from lambda: 0 mm from the anteroposterior, lateral -2.4 mm and dorsoventral 3.9 mm. For the placement of the cannula into RVM, the coordinates were 2.3 mm caudal and 0.2 mm ventral from the intra-aural line. The cannula was fixed into place

with orthodontic resin (L.D. Caulk Co., Milford, DE, USA) and a small screw was fixed in the skull to ensure its immobility. After surgery, the animals received dipyrone (50mg/kg) and enrofloxacin (0.5 mg/kg) and experiments were carried out 7-9 days later. Injection sites were verified by injecting Evans blue dye (1%, 0.5 μ l) and performing 50 μ m postmortem coronal sections (Paxinos and Watson 2007) to determine the location of the dye (Gear and Levine 1995)

2.4 Paradoxical Sleep Deprivation Procedure (PSD)

The rats were submitted to PSD for a period of 24 or 48 h using the single platform method (Lima et al. 2008). Briefly, the rats were placed on 6.5 cm diameter circular platform located in a tank (23 x 23 x 35 cm) filled by water up to 1 cm of the platforms' surface. During paradoxical sleep, rats tend to fall off the platform due to muscular atonia. Therefore, sleep deprivation induced by the platform method involves numerous awakenings which predominantly affect the paradoxical stage of sleep. Such procedure is considered to mimic sleep fragmentation due to repeated awakenings being a useful tool to investigate the effects of sleep loss (Machado et al. 2005). The control groups were maintained under same conditions but there was no water into the cages.

2.5 Behavioral testing

Nociceptive behavioral testing was performed immediately after the end of PSD procedure, during the light phase (between 9:00 AM and 5:00 PM), in a quiet room maintained at 23°C. Before the experiments, each animal was manipulated for 7 days to be habituated to the experimental manipulation. Rats did not have access to food or water during the test, and each animal was used once.

2.5.1 Open field test

The open field area was divided into 16 squares and it consists of a circular area (1 m of diameter) limited by a 40 cm-high wall and illuminated by four 60W lamps situated 48 cm above the arena floor, providing illumination around 300 lx (Broadhurst, 1960). The animals were placed at the corner of the arena and allowed to explore for 5 min. The exploratory behavior was measured by the quantification the number of crossed squares.

2.5.2 Nociceptive mechanical paw withdrawal test

The Randall–Selitto test (Randall and Selitto 1957) was used to assess the nociceptive mechanical paw withdrawal threshold. In this test, a continuous pressure is applied to the dorsal surface of the rat's hind paw until the animal withdrew the paw. A cutoff pressure of 280 g was set to avoid tissue damage. The nociceptive mechanical threshold was defined as the force in grams at which the rat withdrew its paw. The value was obtained from the mean of three readings made in intervals of 5 minutes. Data were expressed in figures as a variation before-after the key intervention. For example, when the aim of the experiment was to determine the effect of PSD (first figure), data were expressed as variation in nociceptive mechanical threshold before PSD – after PSD. When the aim of the experiment was to compare the effect of a drug in control and sleep deprived animals (subsequent figures), data were expressed as variation in nociceptive mechanical threshold before drug administration – after drug administration. In the last case, the evaluated response could be matched between control and sleep deprived rats, allowing a direct comparison of the effect of each drug between groups.

2.5.3 Formalin Test

Each animal was individually placed in a test chamber (30 x 30 x 30 cm mirrored-wood chamber with a glass at the front side) for a 5-minute habituation period to minimize stress. Saline or formalin was administered subcutaneously in the right hind paw, total volume injection was 30 μ l. After the injection, the rats were immediately returned to the test chamber for counting behavioral nociceptive responses, characterized by intense flinches of the injected paw, during a 60-minute observation period. The total number of flinches recorded during the entire duration of the experiment was used as a measure of nociception.

2.6 c-Fos immunohistochemistry

The rats were previously anesthetized by an intramuscular injection of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) immediately after the behavioral test and were intracardially perfused with saline followed by 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed from the skulls and were immersed for 1 week in formaldehyde at 4°C. Subsequently, the brains were placed in 30%

sucrose solution for 48 h before sectioning. Three 40 μ m sections per animal were taken between bregma -7.92 mm and -8.40 mm coordinates to vPAG and between interaural -2.16 mm and -2.40 mm coordinates to RVM (Paxinos and Watson 2007).

Tissue sections were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-c-Fos primary antibody (1:500 in PBS plus 0.3% Triton X-100; antibody catalogue #AB038, Chemicon, USA). Sections were then incubated with a biotin-conjugated secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, USA) for 2h at room temperature. After several washes with PBS, the antibody complex was localized using the ABC system (Vectastain ABC Elite kit, catalogue #PK6101, Vector Laboratories) followed by reaction with 3,3'-diaminobenzidine with nickel enhancement. The sections were then mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped after dehydration ascending concentrations of ethanol-xylene solutions.

2.7 Quantification of c-Fos immunoreactive cells

The slides were digitized with a microscope scanner (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE) coupled to an imaging system (Metasystems, Altlussheim, DE). Quantification of c-Fos immunoreactive cells were performed using ImageJ 1.37c (Public Domain) image analysis software. c-Fos immunoreactive (c-Fos-ir) cells in the vPAG and RVM, were quantified manually using a reticular field. Data are expressed in graphics as the mean number of total c-Fos-ir cells in control and sleep deprived group of rats

2.8 Statistical analysis

One-way ANOVA was used to determine if there were significant differences between groups in figure 1. Two-way ANOVA with two between subject factors (control or PSD) was used to determine if there were significant differences among the groups in the subsequent experiments. Post-hoc contrasts, using the Tukey test, were performed to determine the basis of the significant difference. A Student's unpaired t-test was used to determine if there were significant differences between the number of c-Fos immunoreactive cells in the vPAG and RVM. Data are plotted in figures as mean \pm EPM. The level for statistical significance was $p < 0.05$. SigmaPlot® software (SPSS, Chicago, IL, USA) was used to perform data analysis and graphical representation.

3. Results

3.1. PSD increases nociception

To determine the lowest dose of formalin able to induce nociception, a dose response curve of formalin was conducted.

Formalin induced a dose dependent nociceptive behavior in control animals and the dose of 0.75% was the lowest able to induce nociception (figure 1, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$). This was the dose used in the subsequent experiments because it is easier to visualize any change (increase or decrease) in formalin-induced nociceptive response with intermediate doses.

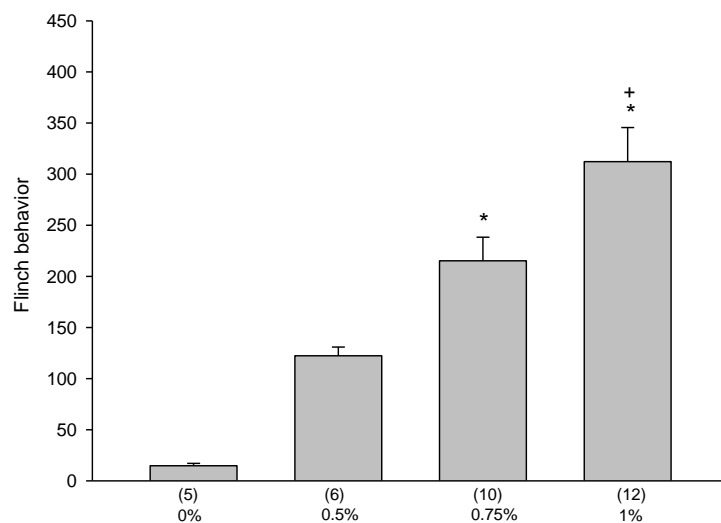


Figure 1. Dose response curve of formalin Formalin induced a dose-dependent nociceptive response. The symbol “*” indicates a response significantly higher than that induced by vehicle (0% group). The symbol “+” indicates a response significantly higher than that of the other groups, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$.

To characterize the pro-nociceptive effect of PSD, the animals were submitted to PSD for 24 h or 48 h and then immediately submitted to the nociceptive tests.

Either 24 h or 48 h of PSD equally and significantly increased nociceptive responses demonstrated by an increase formalin-induced nociceptive behavior (figure 2 A, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$) and a decrease in nociceptive mechanical paw withdrawn threshold (figure 2 B, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after PSD). Taken

together these findings show a potent pronociceptive effect of PSD in two different pain models.

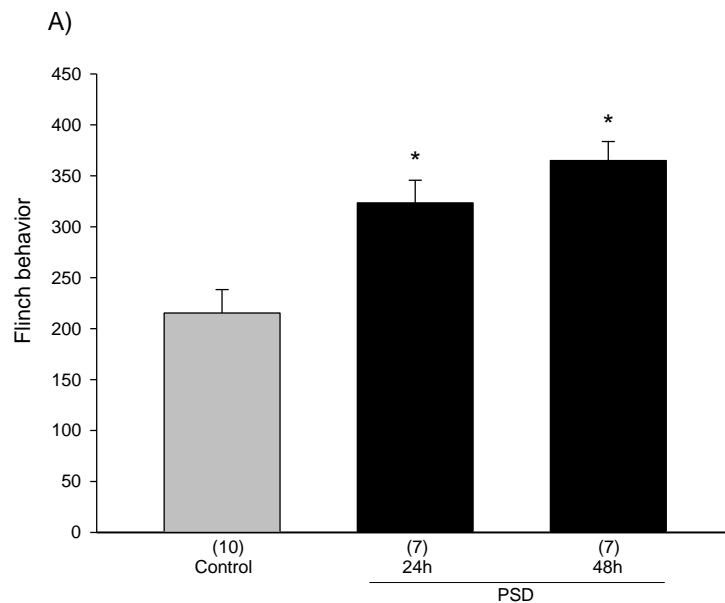
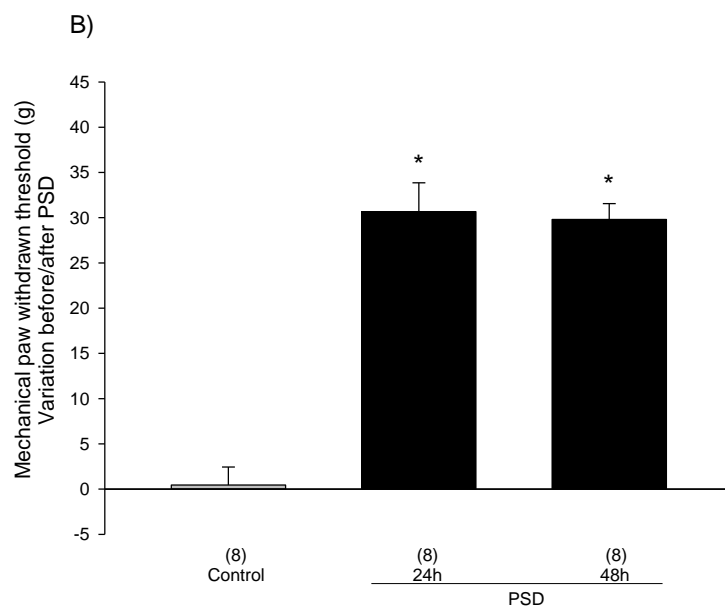


Figure 2. The pronociceptive effect of PSD. (A) The nociceptive behavior induced by 0.75% formalin was significantly increased after PSD for either 24 or 48 hours, as indicated by the symbols “*”, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$.



(B) The nociceptive mechanical paw withdrawal threshold was significantly decreased after PSD for either 24 or 48 hours, as indicated by the symbols “*”. The figure shows the variation in mechanical paw withdrawal threshold before/after PSD, One Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$. In this and in subsequent figures, data are expressed as mean \pm EPM, numbers in parenthesis indicate the number of animals in each group. See methods for additional details regarding data presentation and analysis. PSD = paradoxical sleep deprivation

3.2. PSD decreases the antinociception induced by the administration of morphine into the PAG

To determine whether PSD affects the antinociceptive effect of morphine administered into the PAG, we compared the effect of morphine in control and sleep

deprived rats submitted to the formalin test and the mechanical paw withdrawal test. The formalin test was used because it is a tonic pain model considered representative of clinical pain and morphine is widespread used in different pain conditions. Therefore it is important to determine the effect of PSD in morphine analgesia using a such model. However, the basal response to formalin is different in control and sleep deprived rats, precluding the direct comparison of the effect of any drug between these groups. To solve this problem, we have used in this and in subsequent experiments the mechanical paw withdrawal test expressing the results as a variation before-after drug administration. With this strategy the evaluated response was matched between the groups allowing a direct comparison of the drug effect.

The injection of morphine into the PAG significantly decreased nociceptive responses, demonstrated by a decrease in formalin-induced nociceptive behavior (figure 3 A, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$) and an increase in mechanical paw withdrawn threshold (figure 3 B, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after morphine administration) in control and paradoxical sleep deprived rats. However, some intergroup differences are worthy of attention. In both tests, the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats was similar with the lowest dose of morphine. However, the highest dose of morphine further decreased nociception in control but not in paradoxical sleep deprived animals, suggesting that PSD may blunt the maximal effect of morphine. Taken together, the findings of figure 3 demonstrated that PSD significantly decreases the analgesia induced by the administration of morphine into the vPAG.

The injection of morphine into vPAG did not change the locomotor activity in the open-field ($P > 0.05$, see Table 1).

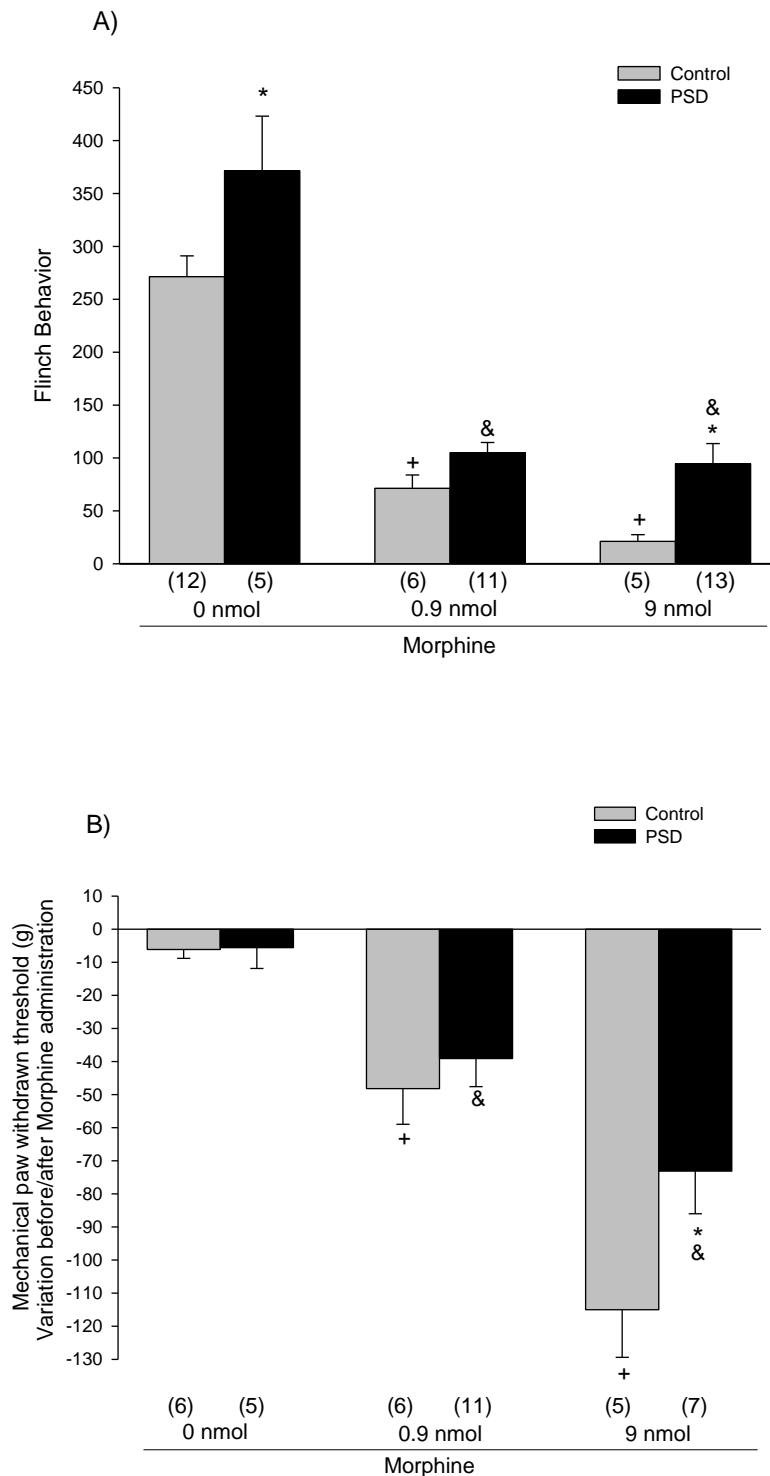


Figure 3. The effect of PSD on morphine-induced antinociception.

(A) Formalin-induced nociceptive behavior was significantly decreased by the microinjection of 0.9 nmol or 9 nmol of morphine into PAG either in control or in paradoxical sleep deprived rats, as indicated by the symbols “+” and “&”, respectively. The symbol “*” indicates a response significantly higher than that of the respective control group (two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

(B) The mechanical paw withdrawal threshold was significantly increased by the microinjection of 0.9 nmol or 9 nmol of morphine into PAG either in control or in paradoxical sleep deprived rats, as indicated by the symbols “+” and “&”, respectively. The symbol “*” indicates a response significantly different to that of the respective control group (two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). In this and in subsequent figures data are expressed as the variation in mechanical paw withdrawal threshold before/after drug administration.

TABLE 1
EFFECT (MEAN \pm E.P.M.) OF INTRA-VPAG OR INTRA-RVM DRUG INJECTIONS ON THE LOCOMOTOR BEHAVIOR IN THE OPEN FIELD TEST

Control Animals		PSD Animals	
Drug treatment	Squares crossed (mean \pm EPM)	Drug treatment	Squares crossed (mean \pm EPM)
Intra vPAG morphine (nmol/0.5ul)		Intra vPAG morphine (nmol/0.5ul)	
0	104,83 \pm 5,74	0	95,25 \pm 9,86
0.9	89,20 \pm 9,05	0.9	78,25 \pm 9,82
9	89,40 \pm 7,71	9	86,40 \pm 7,26
Intra vPAG bicuculine (pmol/0.5ul)		Intra vPAG bicuculine (pmol/0.5ul)	
0	104,83 \pm 5,74	0	95,25 \pm 9,86
30	107,00 \pm 11,16	30	75,33 \pm 10,83
90	79,33 \pm 5,63	90	78,50 \pm 5,23
300	78,20 \pm 4,66	300	89,33 \pm 6,02
Intra-RVM YM022 (pmol/0.5ul)		Intra-RVM YM022 (pmol/0.5ul)	
0	115,20 \pm 13,27	0	89,14 \pm 9,05
0.5	83,75 \pm 9,05	0.5	110,25 \pm 12,61
2	94,33 \pm 5,23	2	146,00 \pm 5,50
Intra-RVM CCK-8 (pmol/0.5ul)		Intra-RVM CCK-8 (pmol/0.5ul)	
0	115,20 \pm 13,27	0	89,14 \pm 9,05
8	86,66 \pm 4,91	8	102,00 \pm 4,91
24	91,00 \pm 14,64	24	77,50 \pm 2,46
Intra-RVM Lidocaine (%)		Intra-RVM Lidocaine (%)	
0	115,20 \pm 13,27	0	89,14 \pm 9,05
2	92,75 \pm 4,58	2	86,66 \pm 6,93

3.3. Pharmacological evidence to suggest that PSD decreases the activity of descending pain inhibitory pathways.

To investigate whether the pro-nociceptive effect of PSD is mediated by a decrease in the endogenous activity of descending pain inhibitory pathways, we injected the GABA_A receptor antagonist, bicuculine, at different doses, into the PAG and evaluated the mechanical paw withdrawal threshold in control and paradoxical sleep deprived rats. Since the descending pain inhibitory pathways are tonically inhibited by GABAergic mechanisms in the PAG, the injection of bicuculine is expected to disinhibit these pathways inducing antinociception.

The microinjection of bicuculline into the PAG significantly decreased the nociceptive response demonstrated by an increase in mechanical paw withdrawal

threshold in control and sleep deprived rats (figure 4, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after bicuculline administration). However, this effect was significantly lower in sleep deprived rats, in that 30 pmol of bicuculline significantly increased mechanical paw threshold in control, but not in sleep deprived rats. This finding is compatible with a higher PAG GABAergic activity in paradoxical sleep deprived rats, since higher doses of bicuculline are needed to block this activity decreasing the nociceptive response in these animals. Therefore, this data support the idea that PSD increases pain, at least in part, by decreasing the endogenous activity of descending pain inhibitory pathways.

Locomotor activity in the open-field was not changed by intra vPAG injection of bicuculline ($P > 0.05$, see Table 1).

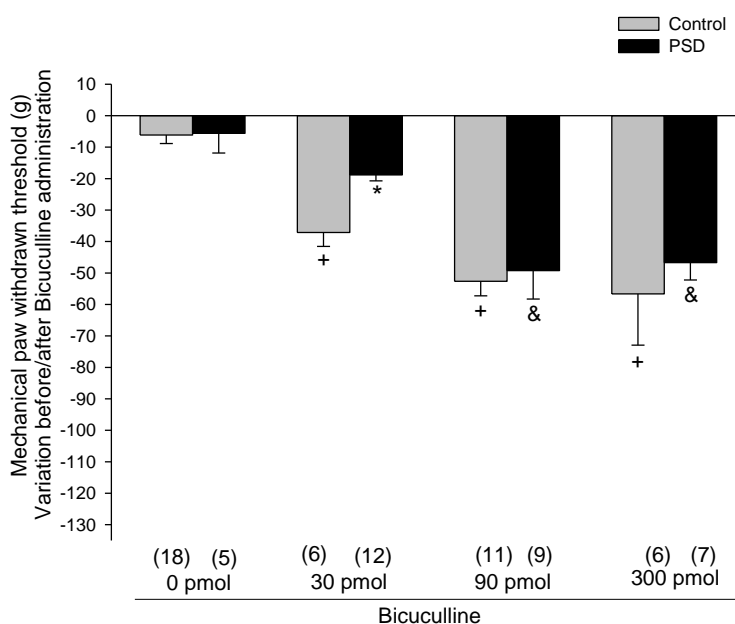


Figure 4. The effect of intra-PAG bicuculline in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats. The mechanical paw withdrawal threshold in control animals was significantly and similarly increased by the intra-PAG injection of bicuculline at the three doses, as indicated by the symbol "+". In paradoxical sleep deprived animals, the mechanical paw withdrawal threshold was significantly increased by the intra-PAG injection of bicuculline at the doses of 90 pmol and 300 pmol, but not at the dose of 30 pmol, as indicated by the symbol "&". The symbol "*" indicates a response significantly different to that of the respective control group (two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

3.4. Pharmacological evidence to suggest that PSD increases the activity of descending pain facilitatory pathways

To investigate whether the pro-nociceptive effect of PSD is mediated by the activity of descending pain facilitatory pathways we injected the CCK 2 receptor antagonist (YM022) or agonist (CCK-8), at different doses, into the RVM and

evaluated the mechanical paw withdrawal threshold in control and sleep deprived rats. Since the endogenous levels of CCK activate descending pain facilitatory pathways at the RVM, the injection of YM022 is expected to inhibit these pathways, blocking eventual pronociceptive actions of endogenous CCK, and that of CCK-8 is expected to activate them, inducing nociception.

The microinjection of YM022 into the RVM significantly decreased the nociceptive response demonstrated by an increase in mechanical paw withdrawal threshold in paradoxical sleep deprived rats. At the dose of 0.5 pmol, YM022 significantly increased mechanical paw withdrawal threshold in sleep deprived, but not in control rats, which exhibited a more discrete effect only with a dose four times higher (figure 5 A, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after YM022 administration). Moreover, the microinjection of CCK-8 into the RVM significantly increased nociceptive response demonstrated by a decrease in mechanical paw withdrawal threshold. However, this effect was significantly higher in control animals, in that 8 pmol of CCK significantly decreased mechanical paw threshold in control, but not in sleep deprived rats, which exhibited a more discrete effect only with a dose three times higher (figure 5 B, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after CCK-8 administration).

The simplest interpretation of these data is that sleep deprived animals present a higher activation of descending pain facilitatory pathways, which could help to explain their enhanced nociceptive response (demonstrated in figure 2). A low dose of YM022 is able to block these pathways inducing antinociception in sleep deprived but not in control animals, in which such pathways are not activated or are less active. Similarly, a low dose of CCK-8 is able to activate facilitatory pathways inducing a pronociceptive effect in control animals, but not in paradoxical sleep deprived, in which such pathways are already activated.

Locomotor activity in the open-field was not changed by intra-RVM injection of YM022 or CCK-8 ($P > 0.05$, see Table 1).

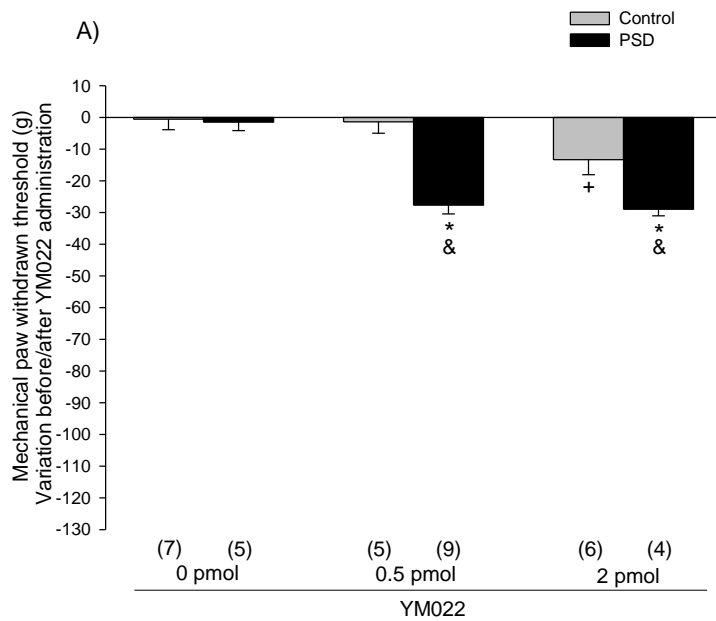
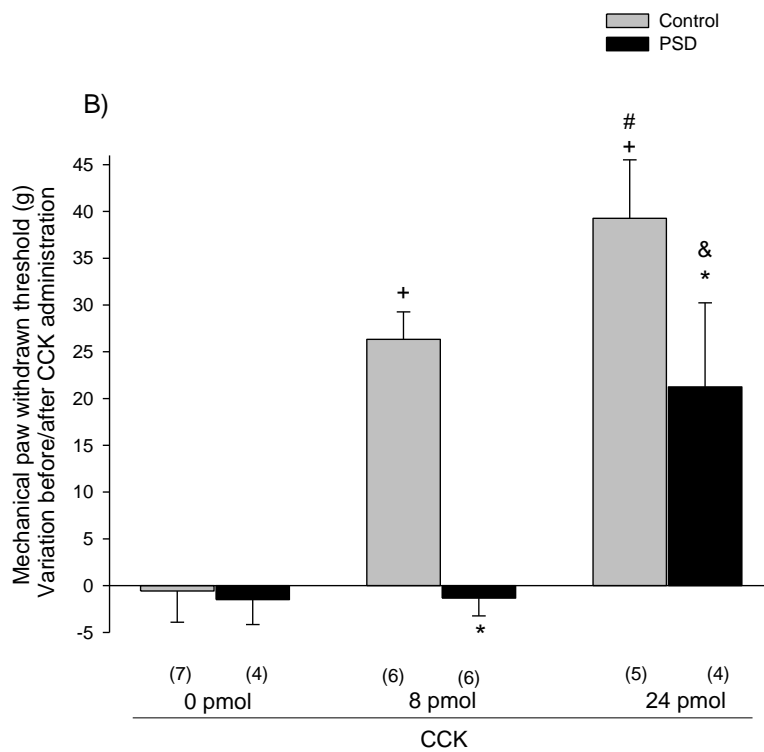


Figure 5. The effect of intra-RVM YM022 or CCK-8 in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats. (A) The mechanical paw withdrawal threshold was significantly increased in sleep deprived rats after the intra-RVM injection of YM022 at the two doses, as indicated by the symbol “&”. In control rats, the intra-RVM injection of YM022 at 2 pmol, but not at 0.5 pmol significantly increased mechanical paw withdrawal threshold, as indicated by the symbol “+”. The symbol “*” indicates a response significantly different to that of the respective control group (Two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).



(B) The mechanical paw withdrawal threshold was significantly decreased in control rats after the intra-RVM injection of CCK at the two doses, as indicated by the symbol “+”. The symbol “#” indicates a significantly higher effect of CCK at 24 pmol than at 8 pmol. In paradoxical sleep deprived rats, mechanical paw withdrawal threshold was significantly decreased by the intra-RVM injection of CCK at 24 pmol, but not at 8 pmol, as indicated by the symbol “&”. The symbol “*” indicates responses significantly different to that of the respective control groups (Two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

3.5. Effect of the blockade of RVM activity by the administration of Lidocaine

To investigate the effect of the blockade of descending activity from the RVM in control and sleep deprived rats we administered 2% lidocaine (QX-314) into the RVM and measured the mechanical paw withdrawal threshold.

The microinjection of Lidocaine into the RVM significantly decreased the nociceptive response demonstrated by an increase in the mechanical paw withdrawal threshold in sleep deprived, but not in control rats (figure 6, Two Way Anova and Tukey test, $p < 0.05$, data are expressed in this figure as a variation before-after lidocaine administration). This finding supports our suggestions that PSD increases pain, at least in part, by increasing the activity of descending pain facilitatory pathways.

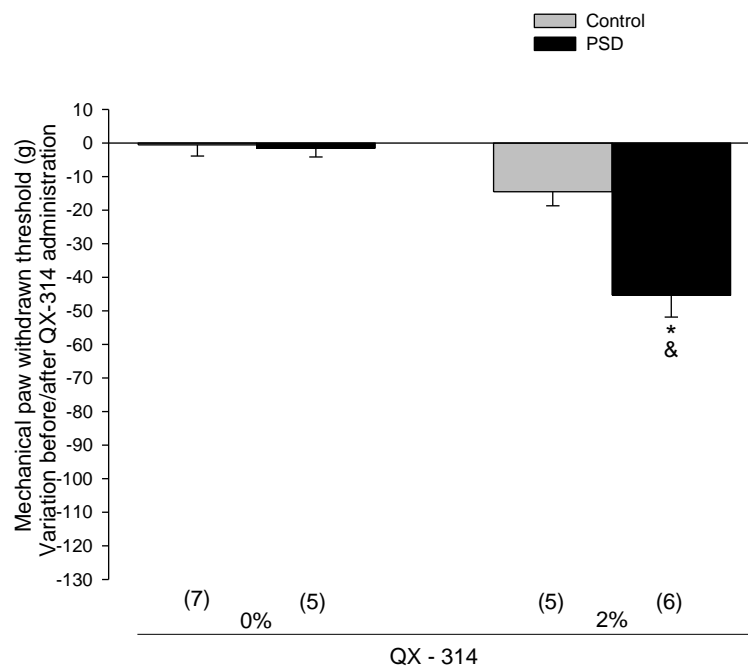


Figure 6. The effect of intra-RVM lidocaine in the nociceptive response of control and paradoxical sleep deprived rats. The mechanical paw withdrawal threshold was significantly increased after the intra-RVM injection of Lidocaine in sleep deprived, but not in control rats, as indicated by the symbol "&". The symbol "*" indicates responses significantly different to that of the respective control groups (Two-way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

3.6 c-Fos expression in vPAG and RVM induced by PSD

The c-Fos protein is rapidly and transiently expressed in neurons in response to stimulation and, therefore, has been used as a marker of neuronal activity. Therefore, we quantified c-Fos expression in order to evaluate the effect of

paradoxical sleep deprivation in the neuronal activity in vPAG and RVM. c-Fos expression in vPAG was not significantly affected by PSD. However, in RVM, c-Fos expression was significantly higher in paradoxical sleep deprived animals when compared with control ones (figure 7, Student's unpaired, t-test, $p < 0.05$). The drugs injections' site in vPAG and RVM are demonstrated in Figure 8.

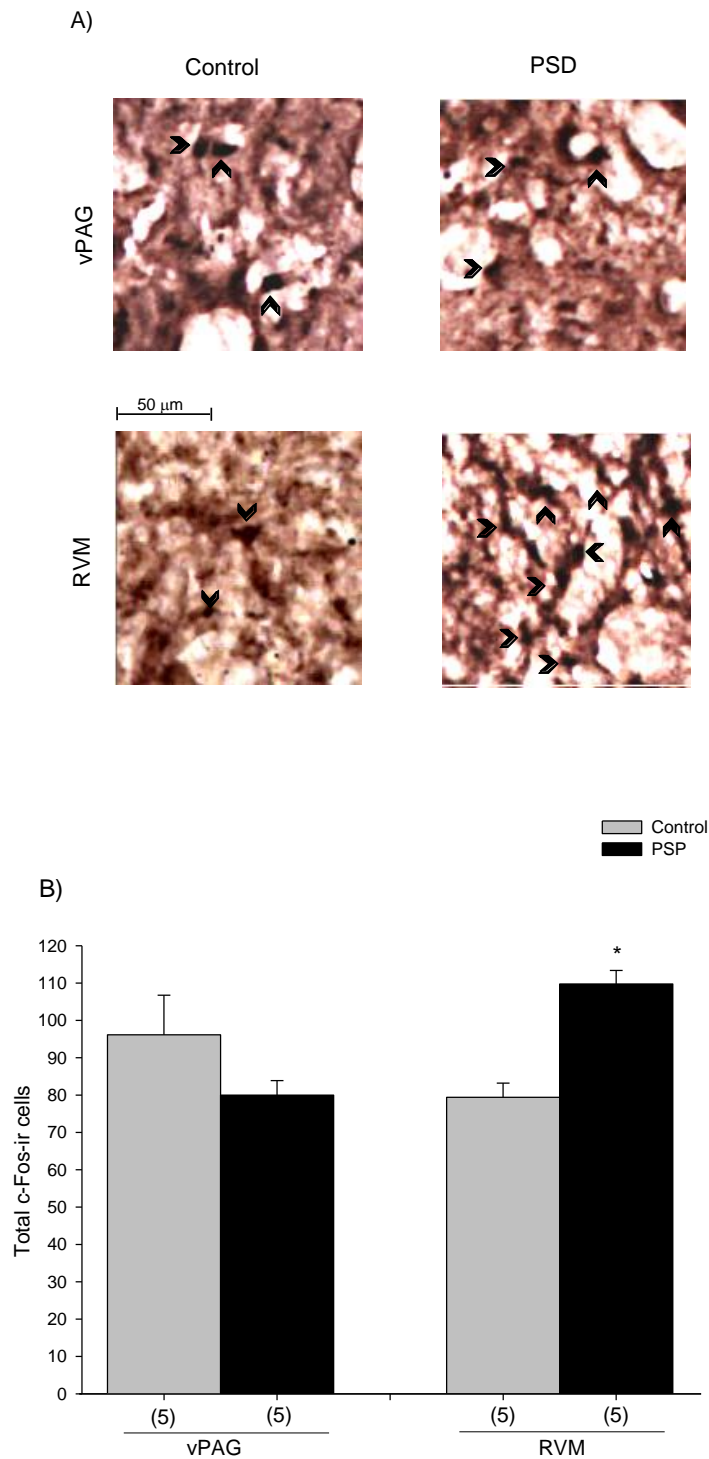
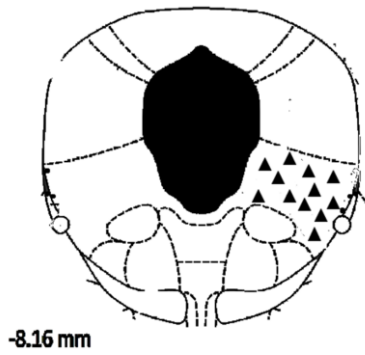


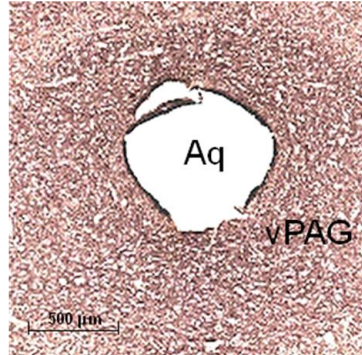
Figure 7. C-fos expression in vPAG and RVM. (A) Photomicrograph of representative sections for each group of c-Fos immunoreactive (c-Fos-ir) cells in vPAG and RVM. Arrows indicate the c-Fos-ir neurons within vPAG and RVM.

(B) Number of c-Fos-ir cells of the control and PSD groups in vPAG and RVM. In the vPAG there was not a statistically significant interaction between PSD and control group (Student's unpaired, t-test, $p = 0.167$). On the other hand, in RVM there was a statically significant difference between control and PSD groups of rats. (Student's unpaired, t-test, $p < 0.001$).

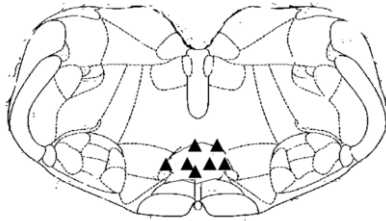
A)



-8.16 mm



B)



-11.28 mm



Figure 7. Representation of injections sites in the vPAG and RVM. Photomicrograph and diagrammatic representation of injections of vehicle (0.9% NaCl) in **(A)** vPAG and **(B)** RVM on cross-sections from the atlas of Paxinos and Watson (2007). These representatives injections sites follow the same pattern for all drug injections in vPAG and RVM. The numbers below the brain diagrams represent the atlas frontal coordinates in millimeters posterior to bregma. Aq: aqueduct of Sylvius. Scale bar = 500 μm.

4. Discussion

This study demonstrated that PSD increases a tonic inflammatory nociceptive response, evaluated by the rat formalin test (figure 2 A) and a phasic nociceptive response, evaluated by the rat paw withdrawal test (figure 2 B). In addition to the potent pro-nociceptive effect, PSD decreases the antinociceptive effect induced by the administration of morphine into the PAG (figure 3). The mechanism by which PSD increases nociception and decreases the antinociceptive effect of morphine may relies on an inhibition of descending pain inhibitory pathways and an activation of descending pain facilitatory pathways. The suggestion that PSD decreases the activity of descending pain inhibitory pathways is based on findings showing that intra-PAG administration of the GABA_A receptor antagonist, bicuculine, at a dose that decreased nociception in control rats did not in paradoxical sleep deprived ones (figure 4). The suggestion that PSD increases the activity of descending pain facilitatory pathways is based on three complementary findings. The first one showing that intra-RVM administration of the CCK 2 receptor antagonist, YM022, at a dose that decreased nociception in paradoxical sleep deprived rats did not in control ones (figure 5 A). The second one showing that the intra-RVM administration of the CCK 2 receptor agonist, CCK-8, at a dose that increased nociception in control rats did not in paradoxical sleep deprived ones (figure 5 B). The third one showing that the blockade of RVM activity, by the intra-RVM administration of lidocaine, decreases nociception in paradoxical sleep deprived but not in control animals (figure 6). The number of squares crossed in the open-field test was not affected by drug treatments, excluding nonspecific motor interference as the main factor accounting for the drug's effect in the nociceptive tests (Table 1).

Although some studies have demonstrated that sleep disturbances increase clinical pain (Gupta et al. 2007; Edwards et al. 2008; Haack et al. 2009) as well as experimental phasic pain responses (Lentz et al. 1999; Onen et al. 2001a; Kundermann et al. 2004; Roehrs et al. 2006; Smith et al. 2007; Kundermann et al. 2008; Haack et al. 2009) in humans, animal studies were so far restricted to phasic pain models. For example, it was demonstrated that PSD decreases thermal (Nascimento et al. 2007; Damasceno et al. 2009; Skinner et al. 2011) and mechanical (Onen et al. 2000; Wei et al. 2008; Wei et al. 2010; Damasceno et al.

2013) nociceptive threshold and increases phasic nociceptive responses in neuropathic (Andersen et al. 2004; Wei et al. 2007) and arthritic (Andersen et al. 2004) pain models. Although a previous study have suggested that PSD does not affect formalin-induced nociception (Onen et al. 2001b), a higher dose (5%) of formalin was used, precluding the visualization of any increase in its response. Our present data demonstrated that PSD increases not only phasic nociceptive responses, as demonstrated by the paw withdrawal test (figure 2 B), but also tonic nociceptive responses, as demonstrated by the (0.75%) formalin test (figure 2 A). Animal models of tonic nociception are considered more representative of clinical pain because in contrast to phasic nociception, measured by an escape or withdrawal response, tonic nociception is a continuous pain induced by a stimulus associated to local damage, having, therefore, a stronger affective-motivational component. Importantly, the pro-nociceptive effect was similar for either 24 h or 48 h of PSD, which is in accordance with previous literature data (Hicks et al. 1978; Wei et al. 2008; Wei et al. 2010) and suggests that the magnitude of the pro-nociceptive effect of PSD does not depend on its duration. Collectively the present data suggest that sleep deprivation increases pain sensitivity independent on either the duration of sleep deprivation or the characteristic of the nociceptive stimulus. Therefore, the increased prevalence of sleep disorders may be one of the factors behind the increased prevalence of pain conditions in the general population.

In accordance with our data, previous studies have already suggested that PSD decreases the analgesic effect of morphine. For example, the increase in thermal nociceptive threshold induced by systemic administration of morphine is decreased by PSD (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011). In the present study, we demonstrated that PSD decreases morphine analgesia in tonic as well as in phasic pain models, since it was demonstrated by using the formalin test (figure 3 A) in addition to the paw withdrawal test (figure 3 B). PSD appears to blunt the maximal effect of morphine, since at the lowest dose, morphine significantly decreased nociception in both control and sleep deprived animals to a point that no differences between them existed. However, at the highest dose, morphine further decreased nociception in control, but not in paradoxical sleep deprived rats. The demonstration that PSD decreases morphine analgesia in two different and classical nociceptive tests supports the idea that patients suffering of sleep disorders and pain may have an impaired response to opioid treatment.

Importantly, this is the first demonstration that PSD decreases the antinociceptive effect induced by the administration of morphine into the PAG, since the other studies have used systemic morphine to evaluate the effect of PSD on its analgesia (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011). The PAG is a key region involved in opioid analgesia. By activating μ -opioid receptors at the PAG, morphine activates descending pain inhibitory pathways and inhibits descending pain facilitatory pathways (Fields 2004). Such pathways originating from the RVM are known to control nociceptive transmission at the spinal dorsal horn (Millan 2002). Therefore, although not directly tested in this study, the mechanism by which PSD decreases morphine analgesia may rely on modulating descending pain pathways.

In fact, in the present study we suggest that PSD decreases the activation of the descending pain inhibitory pathways and increases the activation of descending pain facilitatory pathways to induce its pronociceptive effect. This suggestion is based in pharmacological data showing that control and sleep deprived animals respond differently to drugs that activate or block these pathways. For example, under normal conditions, RVM neurons exert tonic descending inhibition on the nociceptive input (Gilbert and Franklin 2001), but the descending pain inhibitory pathways are controlled by a GABAergic mechanism at the PAG (Millan 1999; 2002; Fields 2004). Therefore the injection of GABA_A receptor antagonists into the PAG is known to induce antinociception by releasing these pathways (Roychowdhury and Fields 1996; Morgan et al. 2003; Hahm et al. 2004; Morgan and Clayton 2005). In this study we demonstrated that a low dose of the GABA_A receptor antagonist, bicuculine, that decreased nociception in control animals did not in sleep deprived ones (figure 4), while increased doses of bicuculine induce a similar antinociceptive effect in both groups. These findings are compatible with a higher PAG GABAergic activity in paradoxical sleep deprived animals because a higher dose of bicuculine was needed to inhibit the PAG GABAergic mechanisms in these animals. Therefore, an increase in GABAergic inhibition of descending pain inhibitory pathways could contribute to the pronociceptive effect of PSD.

On the other hand, the activation of descending pain facilitatory pathways is suggested to be dependent on the endogenous activity of CCK at CCK2 receptors located on the RVM (Heinricher and Neubert 2004; Xie et al. 2005; Marshall et al. 2011). Therefore the RVM injection of CCK 2 receptor antagonists blocks the pain facilitatory mechanisms, blocking eventual pronociceptive actions of endogenous

CCK, while that of CCK receptor agonists further activate them, inducing a pro-nociceptive effect (Heinricher and Neubert 2004; Xie et al. 2005; Marshall et al. 2011). In this study we demonstrated that a low dose of the CCK-2 receptor antagonist, YM022, that decreased nociception in sleep deprived animals did not in control ones, which needed a dose four times higher to exhibited a more discrete antinociceptive effect (figure 5 A). In addition, a low dose of the of the CCK 2 receptor agonist, CCK-8, increased the nociceptive response in control animals, but not in sleep deprived ones, which needed a dose three times higher to exhibited a more discrete pro-nociceptive effect (figure 5 B). Taken together these findings support the idea that descending pain facilitatory pathways are more active in paradoxical sleep deprived than in control rats. Because an intervention to block these pathways, the intra-RVM injection of a low dose of YM022, decreased nociception in sleep deprived, but not in control animals, in which such pathways are not activated or are less active. At the same time, an intervention to activate these pathways, the intra-RVM injection of a low dose of CCK-8, increased nociception in control rats, but not in paradoxical sleep deprived rats, in which such pathways are already activated. The idea that PSD increases the activation of descending pain facilitatory pathways is further supported by the finding that intra-RVM injection of lidocaine (QX-314), decreased nociception in paradoxical sleep deprived but not in control rats (figure 6). Assuming that lidocaine can block neural transmission, it interrupts descending activity from the RVM, decreasing nociception in paradoxical sleep deprived animals in which nociception results from an increased facilitatory activity.

Paradoxical sleep deprivation increased c-Fos expression at RVM but not at vPAG (Figure 7), which supports the idea that PSD by itself activates neuronal mechanisms at RVM region. Some studies have demonstrated that PSD increases c-Fos expression in many brain regions (Pompeiano et al. 1995; Semba et al. 2001; Hsieh et al. 2011). However, to our knowledge this is the first study showing that PSD increases c-Fos expression at RVM. Considering the important role of RVM in descending pain facilitation, this result supports the suggestion that PSD enhances pain by increasing descending pain facilitatory mechanisms.

To our knowledge this is the first evidence that PSD increases pain by modulating the endogenous activity of descending pain modulation system. Previous studies in humans have already suggested that sleep fragmentation is associated to increases in clinical pain and a loss of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC)

(Edwards et al. 2009). However further studies are needed to determine the effects of sleep disturbances in endogenous pain mechanisms as well possible role of such effects for the development or maintenance of persistent pain. The increasingly prevalence of sleep disturbances and pain conditions in the general population highlights the importance to study and understand the bi-directional interaction between sleep and pain.

In summary, this study demonstrated that PSD increases pain independently of its duration or of the characteristic of the nociceptive stimulus. In addition to its pronociceptive effect, PSD decreases the opioid response of PAG, a key region involved in opioid analgesia and endogenous pain modulation. This study also presented pharmacological evidences that PSD increases pain by decreasing descending pain inhibitory activity and by increasing descending pain facilitatory activity. Further studies are needed to determine whether patients suffering of sleep disorders have an impaired response to opioid analgesia, as well as to better characterize the complex effects of PSD in endogenous pain modulation mechanisms. Overall this study contributes to better understand the reciprocal relationship between sleep disturbances and pain conditions, presenting a neural basis to the increased pain sensitivity (Onen et al. 2001a; Kundermann et al. 2008; Haack et al. 2009) or increased predisposition to pain conditions (Gupta et al. 2007; Edwards et al. 2008) in patients suffering of sleep disorders.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que a Privação de Sono Paradoxal (PSP), por um período de 24 ou 48 horas, possui efeito pró-nociceptivo. A PSP aumentou a resposta nociceptiva em dois testes distintos, o teste da formalina na pata de ratos, que avalia uma resposta nociceptiva inflamatória tônica, e o teste de limiar nociceptivo mecânico, que avalia uma resposta nociceptiva fásica. (figura 1).

Além do potente efeito pró-nociceptivo da PSP, esta diminui o efeito antinociceptivo induzido pela administração de morfina na vPAG (figura 2). O mecanismo pelo qual a PSP aumenta a dor e diminui o efeito antinociceptivo da morfina pode depender na inibição das vias descendentes inibitórias da dor e ativação das vias descendentes facilitatórias da dor.

A proposta de que a PSP diminui a atividade das vias descentes inibitórias da modulação da dor está baseada em dados que demonstraram que uma determinada dose de antagonista de receptor GABA_A, bicuculina, administrada na PAG, foi capaz de diminuir a nocicepção em animais controles, no entanto, quando a mesma dose é administrada em animais privados de sono paradoxal essa diminuição da nocicepção não ocorre (figura 3).

Além da diminuição da atividade das vias inibitórias da dor, a PSP pode também aumentar a atividade da via descendente facilitatória de modulação da dor. Essa sugestão está baseada nos resultados que demonstraram que uma determinada dose de antagonista de receptor CCK 2, YM022, foi capaz de diminuir a nocicepção em animais privados de sono paradoxal, mas não diminuiu em animais controles (figura 4 A). Além disso, quando administrado uma determinada dose de agonista de receptor de CCK 2, CCK-8, a nocicepção foi aumentada em animais controles, mas não aumentou a resposta nociceptiva em animais privados. Além disso, o bloqueio da atividade descendente da modulação da dor, por meio da administração de lidocaína dentro do RVM, diminuiu a nocicepção em animais privados, mas não em animais controles (figura 5), o que está de acordo com a ideia de que a PSP pode aumentar a atividade da via descendente facilitatória de modulação da dor. O número de quadrados percorridos no teste de campo aberto não foi alterado por nenhum dos tratamentos farmacológicos. Esse resultado exclui a

ocorrência de interferência motora não específica como o principal fator representando o efeito da droga nos teste nociceptivos (Tabela 1).

Caracterização do efeito pró-nociceptivo da PSP

Embora alguns estudos tenham demonstrado que distúrbios do sono aumentam a dor clínica (Gupta et al. 2007; Edwards et al. 2008; Haack et al. 2009) e também aumentam a resposta a dor fásica (Lentz et al. 1999; Onen et al. 2001a; Kundermann et al. 2004; Roehrs et al. 2006; Smith et al. 2007; Kundermann et al. 2008; Haack et al. 2009) em humanos, estudos em animais estão restritos a modelos de dor fásica. Por exemplo, já foi demonstrado que a PSP diminui o limiar nociceptivo térmico (Nascimento et al. 2007; Damasceno et al. 2009; Skinner et al. 2011), e mecânico (Onen et al. 2000; Wei et al. 2008; Wei et al. 2010; Damasceno et al. 2013) e aumenta a resposta nociceptiva fásica em modelos de dor neuropática (Andersen et al. 2004; Wei et al. 2007) e de artrite (Andersen et al. 2004). Um estudo prévio encontrou que a PSP não afeta a nocicepção induzida por formalina (Onen et al. 2001b), no entanto, uma dose elevada de formalina (5%) foi utilizada, prejudicando a visualização de qualquer aumento na resposta nociceptiva. Nossos presentes resultados demonstraram que a PSP aumenta não somente a resposta nociceptiva fásica, como demonstrado pelo teste de retirada de pata (figura 1 C), mas também aumenta a resposta nociceptiva tônica, como demonstrado por meio do teste de formalina (0,75%).

Modelos animais de nocicepção tônica são considerados mais representativos das condições de dor clínicas porque ao contrário da nocicepção fásica, mensurada por um escape ou resposta de retirada, a nocicepção tônica é uma resposta contínua induzida por um estímulo associado ao um dano tecidual local, possuindo então, um componente afetivo motivacional mais evidente. É importante ressaltar que, o efeito pró-nociceptivo da privação de sono foi semelhante quando a PSP foi induzida por um período de 24 h ou 48 horas, o que está de acordo com dados prévios da literatura (Hicks et al. 1978; Wei et al. 2008; Wei et al. 2010) que sugere que a magnitude do efeito pró-nociceptivo não depende de sua duração.

Portanto, os presentes resultados sugerem que a privação de sono aumenta a sensibilidade à dor independente da duração da privação de sono e da característica do estímulo nociceptivo. Sendo assim, a alta prevalência de distúrbios do sono pode

ser um dos fatores que contribui para a alta prevalência de condições dolorosas na população geral.

O efeito pró-nociceptivo da PSP na analgesia induzida pela administração de morfina na vPAG

De acordo com nossos dados, evidências prévias têm sugerido que a PSP diminui o efeito analgésico da morfina. Por exemplo, o aumento do limiar nociceptivo térmico induzido por administração sistêmica de morfina é diminuída pela PSP (Nascimento et al. 2007; Skinner et al. 2011). No presente estudo, nós demonstramos que a PSP diminui o efeito analgésico da morfina em modelos de dor tônica e fásica, demonstrado por meio do teste de formalina (figura 2 A) e do teste de retirada da pata (figura 2 B), respectivamente. A demonstração de que a PSP diminui o efeito analgésico da morfina em dois diferentes e clássicos testes de nocicepção, fortalece a ideia de que pacientes que sofrem de distúrbios do sono e apresentam alguma condição dolorosa podem apresentar uma resposta diminuída ao tratamento com opióides. A PSP parece atenuar o efeito máximo da morfina, uma vez que em menor dose, a morfina diminuiu significativamente a nocicepção em ambos os grupos, controle e privado, a ponto em que não há diferenças entre eles. No entanto, em maior dose, a morfina diminuiu ainda mais a nocicepção nos animais controles, o que não acontece nos animais privados.

Vale destacar que esta foi a primeira demonstração de que a PSP diminui o efeito antinociceptivo induzido pela administração de morfina na vPAG, uma vez que outros estudos utilizaram morfina sistêmica para avaliar o efeito da PSP na sua analgesia. A PAG é uma região que desempenha função central na analgesia opioide e nos mecanismos endógenos de modulação da dor. Por meio da ativação de receptores opióides na PAG, a morfina ativa vias descendentes de inibição da dor e inibe vias descendentes de facilitação da dor (Fields 2004). Tais vias, originando do RVM, são conhecidas por controlar a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (Millan 2002). Portanto, considerando que a analgesia da morfina depende do sistema descendente da modulação da dor, e que a PSP diminui a analgesia da morfina e aumenta a dor, é sensato supor que a PSP aumenta a dor por modular esse sistema.

A PSP e sua contribuição na atividade endógena das vias descendentes da modulação da dor

Nossos dados sugerem que a PSP diminui a ativação das vias descendentes de inibição da dor e aumenta a ativação das vias descendente de facilitação da dor. Essa sugestão é baseada em dados farmacológicos que demonstraram que animais controles e privados de sono paradoxal respondem de maneira diferente a drogas que ativam ou bloqueiam essas vias.

As vias descendentes inibitórias da dor são tonicamente inibidas por um mecanismo GABAérgico na PAG (Millan 1999; 2002; Fields 2004), portanto, a injeção de antagonistas de receptor GABA_A dentro da PAG é conhecida por induzir antinocicepção ao ativar essas vias (Roychowdhury and Fields 1996; Morgan et al. 2003; Hahm et al. 2004; Morgan and Clayton 2005). Nesse estudo nós demonstramos que uma baixa dose do antagonista de receptor GABA_A, bicuculina, foi suficiente para diminuir a nocicepção em animais controles, mas não em animais privados de sono paradoxal (figura 3). Por outro lado, doses maiores de bicuculina induziram efeito antinociceptivo semelhante em ambos os grupos. Esses dados sugerem que o tônus GABAérgico está aumentado nos animais privados, o que explica porque uma dose maior de bicuculina foi necessária para alcançar o efeito inibitório máximo nos mecanismos GABAérgicos na PAG. Portanto, um aumento da inibição GABAérgica das vias descendentes inibitórias poderiam contribuir para o efeito pronociceptivo da PSP

Por outro lado, a ativação da via descendente facilitatória da modulação da dor é sugerida por ter uma atividade endógena dependente de CCK em receptores CCK 2 localizados no RVM (Heinricher and Neubert 2004; Xie et al. 2005; Marshall et al. 2011). Entretanto, a injeção de antagonista de CCK 2 no RVM bloqueia mecanismos facilitatórios da dor, bloqueando eventuais ações pronociceptivas de CCK endógeno, enquanto agonista de receptor de CCK aumenta a atividade destes, induzindo um efeito pronociceptivo (Heinricher and Neubert 2004; Xie et al. 2005; Marshall et al. 2011). Nesse estudo, nós demonstramos que uma baixa dose de antagonista de CCK-2, YM022, que diminuiu a nocicepção de animais privados, não diminuiu em animais controles, o qual foi necessário uma dose quatro vezes maior para exibir um efeito antinociceptivo mais discreto (figure 4A). Além disso, uma baixa dose de agonista de CCK-2, CCK-8, aumentou a resposta nociceptiva em animais

controles, mas não em animais privados, sendo necessária uma dose três vezes maior para exibir um efeito pronociceptivo mais discreto (figure 4B). Todos esses dados em conjunto sugerem que a ideia de que as vias descendentes facilitatórias da modulação da dor são mais ativas em ratos privados de sono paradoxal a ratos controles. Por meio de intervenção para bloquear essa via, a injeção de uma baixa dose de YM022 no RVM, diminuiu a nocicepção em animais privados, mas não em animais controles, demonstrando que nesses animais controles tais vias não estão ativadas ou estão menos ativadas. Nesses mesmos grupos, com uma intervenção para ativar essas vias, a injeção de uma baixa dose de CCK-8, aumentou a nocicepção em animais controles, mas não em animais privados de sono paradoxal, o que demonstra que tais vias já estão ativadas nesses animais privados de sono. A ideia de que a PSP aumenta a ativação da via descendente facilitatória da dor é mais bem suportada pelo resultado de que a injeção de lidocaína (QX-314) no RVM diminuiu a nocicepção de animais privados de sono paradoxal, mas não nos animais controles (figure 5). Assumindo então que a lidocaína pode bloquear a transmissão neural, interrompendo a atividade descendente do RVM, aumentando a nocicepção em animais privados de sono em que a nocicepção resulta de um aumento da atividade facilitatória da nocicepção.

Para o nosso conhecimento, esta é a primeira evidência de que a PSP aumenta a dor por modular a atividade do sistema descendente da modulação da dor. Estudos prévios em humanos já tiveram sugerido que a fragmentação do sono está associada a aumentos de dor clínica e perda de controles inibitórios nocivos difusos (DNIC) (Edwards et al. 2009). No entanto, mais estudos são necessários para determinar os efeitos de distúrbios do sono em mecanismos endógenos da dor como também suas possíveis funções no desenvolvimento e manutenção de condições de dor persistente. A alta prevalência de distúrbios do sono e de condições dolorosas na população geral ressalta a importância em estudar e entender essa interação bi-direcional entre sono e dor.

A privação de sono paradoxal aumentou a expressão de c-Fos no RVM, mas não na vPAG (Figura 7), o que suporta a ideia de que a PSP sozinha ativa mecanismos na região do RVM. Alguns estudos demonstraram que a PSP aumenta a expressão de c-Fos em várias regiões do cérebro (Pompeiano et al. 1995; Semba et al. 2001; Hsieh et al. 2011). No entanto, para nosso conhecimento, esta é a primeiro estudo demonstrando que a PSP aumenta a expressão de c-Fos no RVM.

Considerando a importante função do RVM no mecanismo descendente facilitatório, este resultado fortalece a sugestão de que a PSP aumenta a dor por aumentar mecanismos da via descendente da modulação da dor.

Considerações Finais

De modo geral, distúrbios do sono tem se tornado cada vez mais comum na sociedade atual. Distúrbios do sono podem contribuir para uma série de problemas de saúde que interferem nas atividades diárias normais do indivíduo (Alvarez and Ayas 2004; Ranjbaran et al. 2007; Santos-Silva et al. 2009). Um desses problemas consiste no aumento da percepção a dor. Há uma interação bidirecional entre dor e distúrbios do sono, entretanto, os mecanismos que correlacionam esses problemas ainda não estão claros, dificultando o tratamento de pacientes que sofrem com problemas do sono e dor. Nesse trabalho, nós demonstramos que a PSP pode aumentar a percepção a dor por alterar o sistema descendente de modulação da dor, destacando a importância de estudar essa via da dor relacionada com o sono, podendo contribuir para futuros alvos farmacológicos para tratamento desses problemas que tanto prejudicam a vida social das pessoas.

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi demonstrado que a PSP aumenta a nocicepção em ratos por aumentar o comportamento nociceptivo induzido pelo teste de formalina, assim como no teste de limiar mecânico. Além disso, a PSP reduziu o efeito antinociceptivo da morfina supra-espinhal. Nós demonstramos também que o efeito pró-nociceptivo da PSP pode ocorrer em parte por uma diminuição do mecanismo descendente inibitório da modulação da dor e em parte pelo aumento da via descendente facilitatória da modulação da dor. Além disso, o efeito pró-nociceptivo da PSP foi revertido pela injeção de lidocaína no RVM. O presente estudo demonstrou uma importante função da PSP em alterações nos mecanismos descendentes da modulação da dor, então contribuindo para um melhor entendimento da correlação entre sono e dor.

REFERÊNCIAS

- Alvarez GG, Ayas NT. The impact of daily sleep duration on health: a review of the literature. *Prog Cardiovasc Nurs* 2004;19(2):56-59.
- Ambriz-Tututi M, Cruz SL, Urquiza-Marin H, Granados-Soto V. Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;98(3):417-424.
- Andersen ML, Silva A, Kawakami R, Tufik S. The effects of sleep deprivation and sleep recovery on pain thresholds of rats with chronic pain. *Sleep Science* 2004;2(2):82-87.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 1953;118(3062):273-274.
- Azevedo E, Manzano GM, Silva A, Martins R, Andersen ML, Tufik S. The effects of total and REM sleep deprivation on laser-evoked potential threshold and pain perception. *Pain* 2011;152(9):2052-2058.
- Baber NS, Dourish CT, Hill DR. The role of CCK caerulein, and CCK antagonists in nociception. *Pain* 1989;39(3):307-328.
- Berger H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1929;87(1):527 - 570.
- Buyssse DJ. Insomnia. *JAMA* 2013;309(7):706-716.
- Carli G, Montesano A, Rapezzi S, Paluffi G. Differential effects of persistent nociceptive stimulation on sleep stages. *Behav Brain Res* 1987;26(2-3):89-98.
- Damasceno F, Skinner GO, Araujo PC, Ferraz MM, Tenorio F, de Almeida OM. Nitric oxide modulates the hyperalgesic response to mechanical noxious stimuli in sleep-deprived rats. *BMC Neurosci* 2013;14(1):92.
- Damasceno F, Skinner GO, Gomes A, Araujo PC, de Almeida OM. Systemic amitriptyline administration does not prevent the increased thermal response induced by paradoxical sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94(1):51-55.
- Edwards RR, Almeida DM, Klick B, Haythornthwaite JA, Smith MT. Duration of sleep contributes to next-day pain report in the general population. *Pain* 2008;137(1):202-207.
- Edwards RR, Grace E, Peterson S, Klick B, Haythornthwaite JA, Smith MT. Sleep continuity and architecture: associations with pain-inhibitory processes in patients with temporomandibular joint disorder. *Eur J Pain* 2009;13(10):1043-1047.
- Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ. Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science* 1983;219(4582):310-312.

Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(7):565-575.

Gear RW, Levine JD. Antinociception produced by an ascending spino-supraspinal pathway. *J Neurosci* 1995;15(4):3154-3161.

Ghilardi JR, Allen CJ, Vigna SR, McVey DC, Mantyh PW. Trigeminal and dorsal root ganglion neurons express CCK receptor binding sites in the rat, rabbit, and monkey: possible site of opiate-CCK analgesic interactions. *J Neurosci* 1992;12(12):4854-4866.

Gilbert AK, Franklin KB. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain* 2001;90(1-2):25-36.

Gupta A, Silman AJ, Ray D, Morriss R, Dickens C, MacFarlane GJ, Chiu YH, Nicholl B, McBeth J. The role of psychosocial factors in predicting the onset of chronic widespread pain: results from a prospective population-based study. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(4):666-671.

Haack M, Lee E, Cohen DA, Mullington JM. Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: potential mediator of increased spontaneous pain. *Pain* 2009;145(1-2):136-141.

Hahm ET, Lee JJ, Min BI, Cho YW. Opioid inhibition of GABAergic neurotransmission in mechanically isolated rat periaqueductal gray neurons. *Neurosci Res* 2004;50(3):343-354.

Heinricher MM, McGaraughty S, Tortorici V. Circuitry underlying antiopioid actions of cholecystinin within the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2001;85(1):280-286.

Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL. Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 1992;48(3):533-543.

Heinricher MM, Neubert MJ. Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystinin in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2004;92(4):1982-1989.

Hicks RA, Moore JD, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. REM sleep deprivation and pain thresholds in rats. *Percept Mot Skills* 1978;47(3 Pt 1):848-850.

Hobson JA. REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(11):803-813.

Hsieh K-C, Gvilia I, Kumar S, Uschakov A, McGinty D, Alam MN, Szymusiak R. c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral hypothalamic areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states. *Neuroscience* 2011;188: 55-67.

Klaue R. Die bioelektrische Tätigkeit der Grosshirnrinde im normalen Schlaf und in der Narkose durch Schlafmittel. *Journal f Psychologie u Neurologie* 1937;47:510-531.

Kovelowski CJ, Ossipov MH, Sun H, Lai J, Malan TP, Porreca F. Supraspinal cholecystokinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain* 2000;87(3):265-273.

Kundermann B, Hemmeter-Spernal J, Huber MT, Krieg JC, Lautenbacher S. Effects of total sleep deprivation in major depression: overnight improvement of mood is accompanied by increased pain sensitivity and augmented pain complaints. *Psychosom Med* 2008;70(1):92-101.

Kundermann B, Spernal J, Huber MT, Krieg JC, Lautenbacher S. Sleep deprivation affects thermal pain thresholds but not somatosensory thresholds in healthy volunteers. *Psychosom Med* 2004;66(6):932-937.

Landolt HP. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans? *Biochem Pharmacol* 2008;75(11):2070-2079.

Lentz MJ, Landis CA, Rothermel J, Shaver JL. Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. *J Rheumatol* 1999;26(7):1586-1592.

Lima MM, Andersen ML, Reksidler AB, Silva A, Zager A, Zanata SM, Vital MA, Tufik S. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav Brain Res* 2008;188(2):406-411.

Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Further Observations on the Potential Rhythms of the Cerebral Cortex during Sleep. *Science* 1935;82(2122):198-200.

Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 2005;160(2):356-364.

Marshall TM, Herman DS, Largent-Milnes TM, Badghisi H, Zuber K, Holt SC, Lai J, Porreca F, Vanderah TW. Activation of descending pain-facilitatory pathways from the rostral ventromedial medulla by cholecystokinin elicits release of prostaglandin-E(2) in the spinal cord. *Pain* 2011;153(1):86-94.

Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 1971;174(4016):1351-1354.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57(1):1-164.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66(6):355-474.

Morgan MM, Bobeck EN, Ingram SL. Glutamate modulation of antinociception, but not tolerance, produced by morphine microinjection into the periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 2009;1295:59-66.

Morgan MM, Clayton CC. Defensive behaviors evoked from the ventrolateral periaqueductal gray of the rat: comparison of opioid and GABA disinhibition. *Behav Brain Res* 2005;164(1):61-66.

Morgan MM, Clayton CC, Lane DA. Behavioral evidence linking opioid-sensitive GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray to morphine tolerance. *Neuroscience* 2003;118(1):227-232.

Morin CM, Gibson D, Wade J. Self-reported sleep and mood disturbance in chronic pain patients. *Clin J Pain* 1998;14(4):311-314.

Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol* 2003;225:115-121.

Nascimento DC, Andersen ML, Hipolide DC, Nobrega JN, Tufik S. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 2007;178(2):216-220.

Nicholson B, Verma S. Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* 2004;5 Suppl 1:S9-S27.

Ohayon MM. Pain sensitivity, depression, and sleep deprivation: links with serotonergic dysfunction. *J Psychiatr Res* 2009;43(16):1243-1245.

Onen SH, Alloui A, Eschallier A, Dubray C. Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat. *Neurosci Lett* 2000;291(1):25-28.

Onen SH, Alloui A, Gross A, Eschallier A, Dubray C. The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *J Sleep Res* 2001a;10(1):35-42.

Onen SH, Alloui A, Jourdan D, Eschallier A, Dubray C. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Res* 2001b;900(2):261-267.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 2007.

Pompeiano M, Cirelli C, Arrighi P, Tononi G. c-Fos expression during wakefulness and sleep. *Neurophysiol Clin* 1995;25:29-341.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111(4):409-419.

Ranjbaran Z, Keefer L, Stepanski E, Farhadi A, Keshavarzian A. The relevance of sleep abnormalities to chronic inflammatory conditions. *Inflamm Res* 2007;56(2):51-57.

Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 1969;164(3878):444-445.

Roehrs T, Hyde M, Blaisdell B, Greenwald M, Roth T. Sleep loss and REM sleep loss are hyperalgesic. *Sleep* 2006;29(2):145-151.

Roychowdhury SM, Fields HL. Endogenous opioids acting at a medullary mu-opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* 1996;74(3):863-872.

Saade NE, Al Amin H, Tchachaghian S, Jabbur SJ, Atweh SF. Alteration of GABAergic and glycinergic mechanisms by lidocaine injection in the rostral ventromedial medulla of neuropathic rats. *Pain* 2010;149(1):89-99.

Santos-Silva R, Tufik S, Conway SG, Taddei JA, Bittencourt LR. Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study: rationale, design, sampling, and procedures. *Sleep Med* 2009;10(6):679-685.

Semba K, Pastorius J, Wilkinson M, Rusak B. Sleep deprivation-induced c-fos and junB expression in the rat brain: effects of duration and timing. *Behavioural Brain Research* 2001;120 75–86.

Skinner GO, Damasceno F, Gomes A, de Almeida OM. Increased pain perception and attenuated opioid antinociception in paradoxical sleep-deprived rats are associated with reduced tyrosine hydroxylase staining in the periaqueductal gray matter and are reversed by L-DOPA. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99(1):94-99.

Smith MT, Edwards RR, McCann UD, Haythornthwaite JA. The effects of sleep deprivation on pain inhibition and spontaneous pain in women. *Sleep* 2007;30(4):494-505.

Smith MT, Perlis ML, Smith MS, Giles DE, Carmody TP. Sleep quality and presleep arousal in chronic pain. *J Behav Med* 2000;23(1):1-13.

Son GH, Chung S, Kim K. The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front Neuroendocrinol* 2011;32(4):451-465.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.

Vera-Portocarrero LP, Ossipov MH, Lai J, King T, Porreca F. Descending facilitatory pathways from the rostroventromedial medulla mediate naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *J Pain* 2011;12(6):667-676.

Wallace DM, Ramos AR, Rundek T. Sleep disorders and stroke. *Int J Stroke* 2012;7(3):231-242.

Wei H, Hao B, Huang JL, Ma AN, Li XY, Wang YX, Pertovaara A. Intrathecal administration of a gap junction decoupler, an inhibitor of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter 1, or a GABA(A) receptor agonist attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;97(2):377-383.

Wei H, Ma A, Wang YX, Pertovaara A. Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation. *Pharmacol Res* 2008;57(6):469-475.

Wei H, Zhao W, Wang YX, Pertovaara A. Pain-related behavior following REM sleep deprivation in the rat: influence of peripheral nerve injury, spinal glutamatergic receptors and nitric oxide. *Brain Res* 2007;1148:105-112.

Xie JY, Herman DS, Stiller CO, Gardell LR, Ossipov MH, Lai J, Porreca F, Vanderah TW. Cholecystikinin in the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 2005;25(2):409-416.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-110.